

THESIS

MUNICH

1966

UNTERSUCHUNGEN ZUR LEBERREGENERATION
IN HYPOPHYSEKТОMIERTEN RATTEN

Hermann Brändle

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. BÜNGELER

UNTERSUCHUNGEN ZUR LEBERREGENERATION
IN HYPOPHYSEKТОMIERTEN RATTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hermann Brändle
aus Kempten

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Prof. Dr. H. WRBA
Korreferent:	Prof. Dr. W. BÜNGELER
Dekan:	Prof. Dr. M. KIESE

Tag der mündlichen Prüfung: 4.10.1966

M E I N E R M U T T E R G E W I D M E T



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153513_0068

Herrn Prof. H. WRBA, meinem Doktorvater, sowie Herrn
Priv. - Doz. Dr. H. RABES danke ich für die Förderung
meiner Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch meiner Frau, die durch Assi-
stenz beim Operieren und bei der Auswertung wesentlich
zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen hat.

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	9
B. MATERIAL UND ARBEITSMETHODEN	10
I. Hypophysektomie	10
II. Hepatektomie	17
III. Explantation	18
IV. Verwendete radioaktive Substanzen	20
V. Messverfahren	21
VI. Autoradiographie	22
C. VERSUCHE UND ERGEBNISSE	23
I. Inkorporation von P^{32} in normale Leber- und Nieren-explantate	23
II. Inkorporation von Thymidin-6-T(n) in normale Leber-explantate	25
III. Inkorporation von P^{32} in die Explantate regenerierender Leber	26
IV. Inkorporation von Thymidin-6-T(n) in Explantate regenerierender Leber	27
V. Bestimmung der Thymidin-6-T(n) Inkorporation in regenerierender Leber	29
VI. Zeitlicher Beginn der DNS-Synthesewelle nach partieller Hepatektomie in Stromazellen (Endothel- und Gallengangszellen)	32
VII. Autoradiographische Untersuchung des Hodens	32

D. DISKUSSION	39
I. Zusammenstellung der bisher zur Leberregeneration bekannten Fakten	39
1. Zeitlicher Ablauf	39
2. Steuerung	40
II. Besprechung der Befunde	44
E. ZUSAMMENFASSUNG	52
F. LITERATURVERZEICHNIS	54

A. EINLEITUNG

Jeder höhere Organismus ist aus Zellen aufgebaut wie ein Haus aus Ziegelsteinen. Ständig werden in diesem Haus alte Ziegel durch neue ersetzt und entstandene Schäden ausgebessert, ohne dass sich -mit gewisser Einschränkung- das Aussehen des Hauses ändert.

Der Vergleich Haus - Organismus hinkt aber insofern, als bei letzterem kein Maurer die Steine auswechselt, sondern vielmehr die Steine selbst, die lebendigen Zellen, entstandene Defekte wieder ausbessern. Sie tun dies, indem sie sich teilen, d.h. vermehren und nach Ausfüllung des Defekts ihr Wachstum wieder einstellen.

Jede Einzelzelle eines Organismus trägt einen kompletten Bauplan des Gesamtorganismus in Form der Chromosomen in sich. Es ist aber weitgehend unbekannt, auf welche Weise sie diesen Bauplan in sich mit der Realität vergleicht, oder -mit anderen Worten ausgedrückt- welche Impulse die Einzelzelle dazu veranlassen zu wachsen, bzw. ihr Wachstum einzustellen.

Die Krebskrankheit, deren Wesen darin besteht, dass Zellwachstum ausserhalb des "Bauplans" ungezügelt voranschreitet, stellt einen besonders aktuellen Aspekt dieses Problems dar.

Als geeignetes Versuchsobjekt zur Erforschung der Regulation der Zellteilung bietet sich die Rattenleber an. Hier folgt der Zweidrittelresektion ein exzessiver Wachstumsvorgang, der innerhalb weniger Tage zur Wiederherstellung der ursprünglichen Leberzellzahl führt und dann gestoppt wird.

Da neben funktioneller Belastung vor allem Hormone als spezifische Wachstumsstimulantien bekannt sind, lag es nahe, den Einfluss der Hypophyse bzw. Hypophysectomie auf die Leberregeneration zu untersuchen.

Diese Aufgabe habe ich mir gestellt.

Im einzelnen liegen den Untersuchungen folgende Fragen zugrunde:

1. Wie verhalten sich normale, regenerierende Rattenleber und solche von hypophysectomierten Ratten in vitro, bezüglich der Kinetik des Einbaus von markiertem Phosphat und Thymidin?
2. Wie ist der zeitliche Ablauf der DNS-Synthese regenerierender Leber von

hypophysektomierten Ratten im Vergleich mit normaler, regenerierender Leber?

3. Gibt es Zusammenhänge zwischen Leberregeneration und Spermiogenese?

Die beiden ersten Fragen waren durch Autoradiographie und Explantationsmethode zugänglich gemacht, die dritte wurde autoradiographisch bearbeitet.

B. MATERIAL UND ARBEITSMETHODEN

I. HYPOPHYSEKTOMIE

Die Hypophysektomie wurde an ca. 180 g schweren, männlichen Sprague-Dawley-Ratten, im grossen und ganzen nach der von REISS, DRUCKREY und HOCHWALD (57) angegebenen Methode durchgeführt. In einigen Einzelheiten wurde die Methode modifiziert, vor allem, um die Operation ohne Assistenz ausführen zu können. Letzteres wurde auch durch Benutzung eines besonderen Operationsbrettes möglich. Dieses hatte die Abmessung 35 x 20 cm und war an den Ecken abgerundet. Um ein Verrutschen des Bretts auf dem Tisch zu vermeiden, wurde es auf der Unterseite mit vier Gummisaugnäpfen versehen. Die Oberfläche des Bretts wurde mit einer Polyesterplatte belegt. In die Schmalkanten des Bretts wurden im Abstand von 1,5 cm rundköpfige Nägel derart eingeschlagen, dass sie noch etwa 1 cm hervorragten. Sie ermöglichten es, den Zug der an Gummischnüren befestigten Haken in jeder beliebigen Richtung der Horizontalen und in beliebiger Stärke zu fixieren. Ausserdem konnten so beliebig viele Haken verwendet werden. Die Haken selbst waren aus V2A-Stahlblech geschnitten, 2,5 mm breit und nach Art eines verkleinerten Roux-Hakens geformt. Am hinteren Ende waren sie zur Befestigung der erwähnten Gummischnur zu einer Öse zurechtgebogen.

Die Beine des Versuchstiers wurden durch Stahlfedern in Form einer ziemlich spitzwinkligen, arabischen Eins fixiert, die ihrerseits ebenfalls mittels Gummischnüren an den beschriebenen Nägeln befestigt wurden. Zur Ruhigstellung des Kopfes diente ein kleiner Stahlring, der einerseits an den Schneidezähnen des Oberkiefers eingehakt, andererseits mittels Gummischnur an einem Nagel der Stirnseite des Bretts befestigt wurde. Eine weitere Arbeitserleichterung be-

der folgenden Verwendung: es Stomachostoma von BAUSCH und LOMD bei einer 10-fachen Vergrößerung.

Im einzelnen wird bei der Operation folgendermassen vorgegangen:

Die ca. 180 g schwere, männliche Ratte wird durch intraperitoneale Injektion von 3 %iger Avertinlösung narkotisiert. Als Dosis wird ein Prozent des Körpergewichts genommen.

Nach Abscheren des Fells im Operationsbereich und Hautdesinfektion mit 70 %igem Alkohol, wird ein medianer Hautschnitt vom Kinnwinkel bis nahe an das Jugulum geführt. Am einfachsten geht dies, indem man am Kinnwinkel mit der Pinzette eine quergestellte Hautfalte aufhebt, diese mit der Schere durchknapst und dann die spitze Scherenbranche durch das entstandene Loch subcutan in die beabsichtigte Schnittstellung bringt. Nach dem Hautschnitt zieht man mit zwei Pinzetten das Bindegewebe zwischen den beiden glandulae submandibulares auseinander, bis man auf die Muskulatur kommt, und schiebt dann die linke Drüse nach aussen ab. Unter ihr kommt der venter anterior des musculus biventer zum Vorschein, an dessen lateralem Rand zwei gut sichtbare Venen von der Kinnspitze her ziehen. Auch das Bindegewebe, das jugulumwärts noch über der Halsmuskulatur liegt, wird in der Medianlinie gefasst und auseinandergezogen bis sich die Trachea in ihrem Anfangsteil als ein muskelbedeckter Schlauch präsentiert. Die auf der Trachea liegende Muskulatur wird nun in der Medianlinie mit dem Graefemesser 1/2 cm weit gespalten und durch Situationsnähte nach links und rechts geheftet, so dass die Trachea auf ihrer Vorderseite völlig freiliegt. Nun macht man, je nachdem, wo es die Schilddrüse zulässt, im Bereich des dritten oder vierten Trachealknorpels mit dem Graefemesser ein winziges Loch zwischen den Knorpelspannen und erweitert es mit einer feinen Pinzette, indem man diese durch die Öffnung einführt und das Bindegewebe nach links und rechts soweit zusammenschiebt, dass die entstandene Öffnung für eine freie Atmung des Tieres ausreicht. Damit hat man sich für den weiteren Verlauf der Operation freie Bahn geschaffen. Andernfalls kommt es bei forciertem Beiseiteziehen des Pharynx während der Operation zu Erstickungsanfällen des Tieres, die immer wieder zur Unterbrechung der Arbeit oder unbemerkt, zu Todesfällen führen. Eine evtl. am Ort der Tracheotomie auftretende Blutung steht immer nach mehrmaligem Absaugen des ausgetretenen Blutes. Zum Absaugen wird dabei eine Wasserstrahlpumpe verwendet, die später auch zum Absaugen der Hypophyse benutzt wird. Zu diesem Zweck wird das Endstück des Saugschlauchs mit einem zugespitzten Glasröhrchen versehen, dessen Öffnung der des Bohrlochs (s.u.) entspricht. Ausserdem wird zwischen Endstück und Pumpe eine Flasche geschaltet, um die

angesaugte Hypophyse zur Vollständigkeitskontrolle aufzufangen. Die Stärke des Sogs wird so eingestellt, dass sie eben ausreicht, um ausgetretenes Blut aufzusaugen. Andernfalls verursacht man durch das Absaugen weitere Blutungen, vor allem beim Absaugen der Hypophyse. Ist nun durch das Loch in der Trachea die freie Atmung des Tieres gewährleistet, geht man am proximalen Drittelpunkt des venter anterior des linken musculus biventer zwischen diesem und den oben beschriebenen Venen mit einer spitzen Pinzette vorsichtig durch die Fascie und dann, die Fasern des musculus mylohyoideus auseinanderdrängend, durch diesen hindurch. Die entstandene Lücke wird durch Spreizen der Pinzette vorsichtig erweitert und mit stumpfen Haken offengehalten, wobei die nervi hypoglossus und mylohyoideus unter den medialen Haken genommen werden. In der Tiefe der Lücke wird nun als heller Punkt der hamulus pterygoideus als Orientierungspunkt für das weitere Vorgehen sichtbar. Das Gebiet lateral und oral dieses Punktes braucht weiterhin nicht berührt zu werden. Auch caudal lateral kann man durch Verletzungen der Ohrkapselvenen kaum stillbare Blutungen hervorrufen, weshalb auch diese Region zu meiden ist. Nachdem man den Pharynx mit einem stumpfen Haken nach medial gezogen hat, geht man vielmehr ca. 1,5 mm proximal und medial des hamulus pterygoideus in die Tiefe und schabt dort den, an der Schädelbasis ansetzenden Muskel vom Knochen ab. Man fühlt dabei unter der Pinzette eine querverlaufende Erhebung des Knochens, die sich nach Abschaben des Muskels als heller Strich abzeichnet und die Naht zwischen os sphenoidale und os occipitale darstellt. Da an dieser Linie oralwärts der Nasopharynx als häutiger Sack ansetzt, der nach Möglichkeit nicht verletzt werden sollte, empfiehlt es sich, den Muskel von proximal her nach proximal schabend bis zur beschriebenen Linie vom Knochen abzulösen und dann den Pharynx nach oral vom Knochen abzuschieben, was etwa 1,5 mm weit möglich ist. Es genügt dabei, eine Fläche freizulegen, die gross genug ist, dass ein Zahnkugelbohrer Nr. 5 den Knochen dort durchdringen kann, ohne Weichteile zu zerreißen. Das Bohrloch selbst muss so angelegt werden, dass ein Drittel davon proximal der Knochennaht, zwei Drittel oralwärts der Knochennaht zu liegen kommen. Lateral soll es bis hart an den medialen Ohrkapselrand reichen. Erfahrungsgemäss genügt es, den Knochen mit dem Zahnkugelbohrer Nr. 5 ganz zu durchbohren, um dann bei leichtem Ansaugen die Hypophyse ganz zu gewinnen. Das Arbeiten mit größeren Bohrern erhöht die Operationsletalität. Wenn man einen scharfen Bohrer mit leichter Hand aufsetzt, lässt sich ein Abrutschen auf dem oralwärts abhängigen Knochen unschwer vermeiden, so daß es unnötig erscheint, den Knochen vorher mit größeren Bohrern zu planieren. In etwa 90 % aller Fälle folgt die Hypophyse bei der beschriebenen Lokalisation des Bohrlochs bei Ratten von ca. 180 g Gewicht dem ersten Saugversuch. Dieses Verfahren ist damit wegen seiner we-

sentlich geringeren Operationsletalität dem Absaugen unter Kontrolle des Auges nach Planieren des Knochens bis zur Durchsichtigkeit vorzuziehen. Beim Bohren ist unbedingt zu beachten, dass die Verbindungslinie zwischen den beiden hamuli pterygoidei auf keinen Fall nach oral überschritten wird, weil hier ein transversaler Venenkanal das os sphenoidale durchzieht, auf den die anfangs angeführten Autoren besonders hinwiesen. Die Verletzung dieses Kanals bedeutet immer den Tod des Tieres. Ein weiterer häufiger Grund für den Tod der Versuchstiere sind Blutungen in den Nasenrachenraum, die zum Ersticken der Tiere führen. Hat man also den Pharynx verletzt oder eine stärkere Blutung nach dem Absaugen der Hypophyse, so darf die Operationswunde erst geschlossen werden, wenn das Blut abgesaugt ist und die Blutung steht. Auch ist empfehlenswert vor Verschluss der Wunde aus der Trachea Schleim und Blut abzusaugen. Erscheint die Hypophyse einmal nicht beim ersten Ansaugen, so hilft forciertes Saugen auf keinen Fall. Es führt nur zu verstärkten Blutungen. Es ist vielmehr zu prüfen, ob der Knochen ganz durchbohrt ist. Ist es der Fall, so ist bei Verwendung scharfer Bohrer in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle auch die Hypophysenkapsel aufgerissen, so dass bei einem Misserfolg auch die Verwendung des Graefemessers keine nennenswerten Chancen bietet. Fast immer sitzt dann das Bohrloch an falscher Stelle. Erweiterungen des Bohrlochs sind mit einer sehr hohen Letalität belastet.

Es ist nicht nötig, nach Absaugen der Hypophyse das Trepanationsloch oder das Loch in der Trachea zu verschliessen. Nach Sistieren aller Blutungen werden lediglich die Haken aus der Wunde genommen und die Situationsnähte aus der Halsmuskulatur über der Trachea entfernt, worauf sich diese über das Loch legt. Dann wird die Wunde durch eine fortlaufende Hautnaht mit Seide verschlossen. Die Dauer der Operation schwankt zwischen sieben und fünfzehn Minuten. Die Tiere erhalten in der Folgezeit keine besondere Medikation. Es ist darauf zu achten, dass sie immer genug Trinkwasser haben. An heissen Tagen war die Sterblichkeit besonders hoch.

Der Erfolg der Operation wurde dreifach überprüft:

Erstens wurde das abgesaugte Gewebe aufgefangen, wobei sich die drei Lappen der Hypophyse gut erkennen lassen.

Zweitens wurde am Ende des Versuchs der Schädel des Tieres geöffnet und makroskopisch das Fehlen der Hypophyse bestätigt.

Drittens wurden bei Versuchsabschluss die Hoden der Tiere entnommen, zerlegt und histologisch untersucht.

Der durchschnittliche Quotient aus Körpergewicht und Hodengewicht (ein Hoden) betrug bei den hypophysektomierten Tieren 665, bei den Kontrolltieren 174. Histologisch war in allen Hoden der Kontrolltiere Spermiogenese nachzuweisen. In den Hoden der hypophysektomierten Ratten fanden sich jedoch in keinem Fall Spermien oder ihre direkten Vorstufen, sondern alle Zeichen der Atrophie, wie sie TONUTTI (68), MUSCHKE (45) und MARESCOTTI (42) beschreiben. Tiere mit normalgewichtigen Hoden oder Anzeichen bestehender Spermiogenese kamen nicht in den Versuch. Die wichtigsten Phasen der Operation sind noch einmal durch folgende Fotos deutlich gemacht.



ABBILDUNG 1

Nach medialem Hautschnitt von der Kinnspitze bis nahe ans Jugulum liegen die submandibularen Drüsen vor.

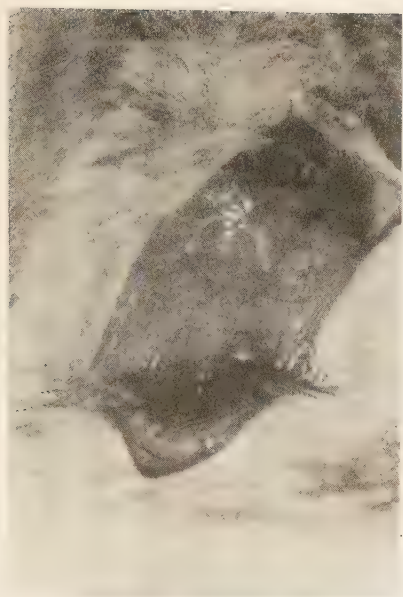


ABBILDUNG 2

Die linke Glandula submandibularis ist nach lateral gedrängt. Die über der Trachea liegende Muskulatur ist in der Medianen gespalten und zur Seite geheftet. In der Trachea ist die künstliche Atemöffnung sichtbar.



ABBILDUNG 3

Am lateralen Rand des venter anterior des musculus biventer wurde in die Tiefe gegangen. Die Fasern des m. mylohyoideus sind an dieser Stelle durch die Haken auseinandergezogen. In der Tiefe der Lücke ist die Spitze des hamulus pterygoideus als helle Erhebung sichtbar.



ABBILDUNG 4

Durch entsprechenden Hakenzug wurde die Fascienlücke etwas nach proximal verlegt. Der hamulus pterygoideus ist jetzt an der Oberkante des linken oberen Hakens als heller Punkt sichtbar. Proximal davon ist die Muskulatur vom Schädelknochen abgeschabt. Als querverlaufende, doppelt konturierte Linie markiert sich hier die Naht zwischen os sphenoidale und os occipitale.



ABBILDUNG 5

Das Bohrloch ist zu zwei Dritteln oral, zu einem Drittel über und proximal der Knochennaht angelegt. Die helle Hypophyse schimmert in der Tiefe des Bohrlochs.

ABBILDUNG 6

Die Hypophyse ist abgesaugt und in ihrer charakteristischen Form am rechten Bildrand auf dem Mulltupfer liegend abgebildet. Es besteht keine Blutung aus dem Bohrloch.



II. HEPATEKTOMIE

Die Hepatektomie wurde nach dem von HIGGINS (28) angegebenen Verfahren durchgeführt. Dabei wird dem Tier in Äthernarkose das Fell im Operationsgebiet geschoren und die Haut mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Dann werden in der Medianlinie des Oberbauchs erst die Haut, dann Muskulatur und Peritoneum mit der Schere bis zum processus ensiformis eröffnet. Mit weiteren Scherenschlägen werden die Peritonealduplikaturen, die von ventral und dorsal an die einzelnen Leberlappen ziehen für den obersten und mittleren der drei großen Leberlappen durchtrennt, so daß diese gut beweglich werden. Mit zwei Pinzetten wird nun ein Seidenfaden unter den obersten Leberlappen so hoch wie möglich an den Hilus geschoben und dort eine Ligatur angebracht. Jetzt wird der Leberlappen angenoben und mit einem einzigen Scherenschlag knapp an der Ligatur durchrennt und entfernt. In gleicher Weise wird mit dem linken lateralen Leberlappen verfahren. Dadurch werden etwa 66% der Gesamtleber entfernt. Wenn aus den resezierten Leberstücken Blut in die Bauchhöhle getropft ist, wird diese vorsichtig ausgetupft, um Verwachsungen vorzubeugen. Dann werden erst Peritoneum und Muskulatur, dann die Haut mit jeweils einer einzigen fortlaufenden Seidennaht verschlossen. Eine spezielle Nachbehandlung der operierten Tiere erübrigt sich. Die Sterblichkeit normaler Ratten liegt bei dieser Operation bei Null. Dagegen überleben weniger als die Hälfte der hypophysektomierten Ratten diese Operation. Es ist zu

gewisse Abhängigkeit von Sterblichkeit und Wetter zu beobachten. An kühlen Tagen sind die Operationsergebnisse wesentlich besser als bei heissem, schwülem oder föhnigem Wetter.

Um den Einfluss der von JAFFE (30) beschriebenen Tagesperiodik in der Mitoseaktivität auszuschalten, wurden alle Operationen in der Zeit zwischen zehn und vierzehn Uhr ausgeführt.

III. EXPLANTATION

Diese Methode ermöglicht es, Organteile verschiedener Tiere unter völlig gleichen Bedingungen zu bringen und in ihrer Stoffwechselleistung zu vergleichen. Dabei ist von Bedeutung, dass die in vivo bestehende Stoffwechselaktivität in vitro eine Zeitlang beibehalten wird (79, 78), so dass aus den in vitro gewonnenen Ergebnissen Rückschlüsse auf die Stoffwechselaktivität in vivo gezogen werden können.

Im einzelnen geht man folgendermassen vor:

Zunächst wird in einem sterilen Glaskolben das ganze, für den Versuch benötigte Kulturmedium zubereitet.

Es besteht aus:

- 10 % Embryonalextrakt,
- 20 % Kälberserum,
- 70 % Hanks-Lösung.

Da jedem Versuchsröhrchen die Explantate in $0,5 \text{ cm}^3$ Hanks-Lösung zugesetzt werden, muss diese Menge bei Ansatz des Gesamtmediums abgezogen werden. Zuletzt werden der Gesamtmenge pro ml $0,2 \mu\text{C } \text{P}^{32}$ bzw. $1,0 \mu\text{C}$ Thymidin H^3 zugesetzt. Dann wird die Flüssigkeit durch Schwenken des Kolbens gründlich durchgemischt und unter sterilen Kautelen in die Rollerröhrchen abgefüllt. Diese Rollerröhrchen haben Form und Grösse von Reagenzgläsern und sind mit einem geschliffenen Glasstöpsel versehen. Sie werden mit je 2,5 ml der Kulturflüssigkeit beschickt und mit der Ansatznummer gekennzeichnet.

Jetzt werden die Wiegezyylinder steril mit je 0,5 ml Hanks-Lösung gefüllt und in Petrischalen bereitgestellt. Andere Petrischalen, die die ganzen, lebensfrischen Lebern zunächst aufnehmen sollen, werden zur Hälfte mit steriler, kalter Hanks-Lösung gefüllt.

Nun werden die Versuchstiere durch Nackenschlag getötet und sofort die Lebern steril entnommen und in die vorbereitete Hanks-Lösung gelegt. Von hier aus werden die Lebern so schnell als möglich mit zwei Fingern oder auf einer sterilen Glasplatte in möglichst dünne Scheibchen, diese wiederum in Balken und schliesslich in Würfel geschnitten. Das Gewicht eines solchen Einzelwürfels sollte zwischen 1 und 2 mg liegen, wobei die Kantenlängen zwischen 0,8 und 1,0 mm betragen. Die Würfel werden wieder in kalter Hanks-Lösung aufgeschwemmt. Sind alle Lebern so verarbeitet, beginnt das Wiegen. Dabei wird zuerst jeweils der Wiegezyylinder mit 0,5 ml Hanks-Lösung gewogen. Dann erfolgt das Wiegen der Explantate. Da es bei dem angegebenen Schneiderverfahren nicht möglich ist, lauter gleich grosse Leberwürfelchen herzustellen, muss pro Ansatz eine grosse Anzahl Explantate inkubiert werden, um den dadurch bedingten Fehler auszugleichen. In der vorliegenden Arbeit wurden pro Ansatz 18 Explantate inkubiert. Diese 18 Explantate werden mit Hilfe der Messerchen in den Wiegezyylinder gebracht und gewogen. Es empfiehlt sich dabei, dreimal je sechs Würfelchen auf die Messerklinge aufzuladen und dann in den Wiegezyylinder abzustreifen, um den unvermeidlichen Flüssigkeitstransport möglichst gering und konstant zu halten. Aus demselben Grund sollten beim Zustandekommen stark von den Kontrollen abweichender Gewichte, nicht einzelne Würfel ausgewechselt werden, sondern eine komplette Neueinwiegung vorgenommen werden. Um den durch Verdunstung der Wiegeflüssigkeit entstehenden Fehler hinanzuhalten, muss die Wiegezeit mit der Stoppuhr gemessen und konstant gehalten werden. Auch ist es von Vorteil, jeweils mehrere Ansätze der gleichen Art zu machen. Andererseits leiden die Explantate, wenn sie zu lange in reiner Hanks-Lösung liegen, wie dies die Herstellung mehrerer Ansätze zwangsläufig mit sich bringt. Zudem quellen die Explantate in der Hanks-Lösung bei längerem Liegen, wodurch auch die Wiegeergebnisse verfälscht werden.

Sind die Explantate für alle Ansätze gewogen, werden sie samt der Hanks-Lösung mittels einer weitlumigen Pipette in die Rolleröhrchen gebracht, wobei darauf zu achten ist, dass keines der Explantate an der unbenerzten Wand des Röhrchens kleben bleibt. 20 Stunden lang werden die Röhrchen nun bei 38°C im Rollerapparat inkubiert. Durch Rotation der Haltetrommel der schräggestellten Röhrchen (30 Umdrehungen/min.) werden die Explantate im Nährmedium in dauernder Bewegung gehalten. Dadurch wird ein guter Stoffaustausch zwischen Explantat und Medium, sowie bessere Lösung von Luftsauerstoff im Medium bewirkt. Nach Untersuchungen von RABES (54) ist es nicht sinnvoll, länger als 20 Stunden zu inkubieren, da das Stoffwechseloptimum von Explantaten nach 18 Stunden erreicht ist und danach ihre Vitalität und Stoffwechsel

schnell abnehmen.

Nach Beendigung der Kultur wird das Medium abpipettiert. Dann werden die Explantate in eisgekühlter Hanks-Lösung gewaschen, indem dreimal nacheinander in jedes Röhrchen 6 ml Hanks-Lösung gegeben werden und man diese sorgfältig wieder abpipettiert.

Die Grenzen und Fehler des Verfahrens wurden von DOERR (16) im einzelnen festgestellt. Danach beträgt der methodische Fehler des Verfahrens $\pm 15\%$. Er konnte durch Verbesserung des Wiegeverfahrens merklich gesenkt werden. Die maximale Abweichung von Ergebnissen doppelter Ansätze betrug 10% . Ein grosser Nachteil dieser Untersuchungsmethode ist es, dass die Werte aus verschiedenen Versuchen nicht direkt verglichen werden können. Es sind nämlich sowohl Embryonalextrakt wie Kälberserum von Versuch zu Versuch von verschiedener Qualität und nicht konstant zu halten. Das Bereitstellen grosser Vorräte bietet keinen Vorteil, da sich allein mit der Zeit Eigenschaften des Nährmediums ändern. Auch ist die Dosierung der radioaktiven Substanz, vor allem des P^{32} , wegen dessen kurzer Halbwertszeit äusserst schwierig. So kann lediglich in jedem Einzelversuch das Ergebnis des Versuchstiers auf jenes des Kontrolltiers bezogen werden. Damit gewinnt die beachtliche biologische Streuung grosses Gewicht. Im ungünstigsten Fall addiert sie sich mit der methodisch bedingten, so dass das eigentliche Ergebnis des Versuchs unter Umständen nicht mehr sichtbar wird. Es wäre demnach eine hohe Anzahl von Kontrolltieren und Ansätzen in einem Versuchsgang wünschenswert. Dem ist aber -wie schon aufgeführt- durch die komplizierte Versuchsvorbereitung und die kurze Zeit, die dafür aufgewendet werden darf, eine enge Grenze gesetzt. In der vorliegenden Arbeit musste eine Beschränkung auf den jeweils doppelten Ansatz einer Kontrolleber in Kauf genommen werden.

IV. VERWENDETE RADIOAKTIVE SUBSTANZEN

P^{32} wurde als Orthophosphat in verdünnter HCl-Lösung mit pH 2-3, sterilisiert, trägerfrei, mit einer spezifischen Aktivität über $1 \text{ mC}/\mu\text{g}$ Phosphat, vom Radiochemical Center Amersham bezogen.

Dem Kulturmedium wurde es in einer Menge von ca $0,2 \mu\text{C}/\text{ml}$ zugesetzt.

Dieses radioaktive Phosphat wird in verschiedene chemische Fraktionen einge-

baut. Seine Inkorporierung in organische Verbindungen ist proportional der Aktivität der Phosphorylierungsprozesse (81). Das Mass des Einbaus von Phosphat³² ist daher als Indikator für den Energiestoffwechsel zu verwenden.

Markiertes Thymidin stand als Thymidin-6-T(n) mit einer spezifischen Aktivität von 1,9 C/mM zur Verfügung.

Dem Kulturmedium wurde es in einer Menge von 1,0 $\mu\text{C}/\text{ml}$ zugesetzt. Bei Versuchen in vivo erhielten die Tiere 0,8 $\mu\text{C}/\text{g}$ Körpergewicht in 1 cm^3 Hanks-Lösung intraperitoneal.

Thymidin wird als spezifischer Vorläufer der Desoxyribonucleinsäure (DNS) in messbarem Umfang in DNS-synthetisierende Zellen eingebaut und gibt so bei direkter Messung seines Einbaus ein Mass für die DNS-Synthese, bei Verwendung zur Autoradiographie die Zahl der DNS-synthetisierenden Zellen.

V. MESSVERFAHREN

Die mit P^{32} inkubierten Explantate werden aus einem Tropfen Hanks-Lösung mit Hilfe der Irismesserchen zu je sechs symmetrisch auf genormten Messtiegeln verteilt und bei 60°C 24 Stunden lang getrocknet. Zu der nun folgenden Aktivitätsbestimmung wurde mit dem Endfensterzählrohr FHZ 81 (FRIESEKE und HOEPFNER), Fensterdicke 3,61 mg/cm^2 , in Bleiabschirmung mit dem Zählgerät FH 91 (FRIESEKE und HOEPFNER) bei einer Spannung von 750 Volt mit Berger-Zeit-Stoppuhr (ZM 4) gearbeitet.

Es wurden nur relative Messungen durchgeführt. Die Voraussetzung für diese Art der Messung, nämlich gleiche Dicke, Abmessung und räumliche Anordnung in Bezug auf das Zählrohr, war bei der oben geschilderten Placierung der Explantate gegeben. Sie wurden auch sonst unter gleichen Bedingungen gemessen. Da auf die Berechnung der absoluten Aktivität verzichtet wurde und die Messbedingungen identisch gehalten wurden, erübrigten sich Korrekturen der Messergebnisse bezüglich Raumwinkel, Reflexion an der Unterlage, Eigenabsorption ect..

Die Ergebnisse der Relativmessungen wurden zunächst in Impulsen pro Minute und mg Gewicht ausgedrückt und schliesslich in Prozent umgerechnet, wobei die einzelnen Werte auf die Ergebnisse der gemittelten Kontrollansätze bezogen wurden.

Die mit Thymidin-6-T(n) (Radiochemical Centre Amersham) inkubierten Explan-

Die wurden nach der beschriebenen Methode (54) getrocknet, verascht, graviert und im Flüssigkeitsszintillationszähler (PACKARD, Modell 3214) gemessen. Die Aktivität wurde ausgedrückt in Zerfällen pro Minute und mg Trockengewicht. Auch hier fällt wie bei der Inkubation mit p^{32} der eigentliche Messfehler gegenüber der biologischen Streuung nicht ins Gewicht.

Zur Bestimmung des in vivo inkorporierten radioaktiven Thymins wurde die Leber dem eben durch Nackenschlag getöteten Tier entnommen und sofort in festem CO_2 tiefgefroren. Dann wurde aus 0,5 g Leber die DNS in der von HECHT und POTTER (26) beschriebenen Art extrahiert. Die Aktivität aliquoter Teile des Extrakts wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler (PACKARD, Modell 3214) gemessen. Durch Zusatz eines inneren Standards wurde die Zahl der Zerfälle pro Minute korrigiert. Der Gehalt an DNS wurde mit Diphenylamin nach DISCHE (15) photometrisch bestimmt.

VI. AUTORADIOGRAPHIE

Die Versuchstiere erhielten eine intraperitoneale Injektion von $0,8 \mu C/g$ Körpergewicht Thymidin-6-T(n) (spez. Aktivität $1,0 C_i/mM$) in $1 cm^3$ Hanks-Lösung und wurden 60 Minuten danach durch Nackenschlag getötet. Die Lebern, Hoden und Nieren wurden entnommen und in 10 %igem neutralem Formalin fixiert. In der üblichen Weise wurden Paraffinschnitte von 5μ Dicke angefertigt und mit flüssiger Emulsion K2 von ILFORD überschichtet und für 21 Tage bei $+4^\circ C$ exponiert. Nach Entwicklung (Amidol, Na_2SO_4 , KBr) und Fixierung (Natriumthiosulfat) wurden die Schnitte durch die Emulsion hindurch mit Haemalaun gefärbt.

DNS-synthetisierende Zellen zeigen sich nun dadurch an, dass das inkorporierte radioaktive Thymidin über sich metallisches Silber in Form schwarzer Körnchen aus der Emulsion gefällt hat. Die Zahl solcherart markierter Zellen wird in Beziehung gesetzt zur Gesamtzellzahl (= Markierungsindex), indem in meanderförmigem Zählgang 10 000 Leberparenchymzellen ausgezählt werden. Dabei wurden nur Zellkerne gezählt, die durch den Schnitt ganz getroffen waren. Nur angeschnittene Zellkerne sind möglicherweise so dünn, dass sie trotz Thymidininkorporation nicht sichtbar markiert sind und so bei Mitzählung einen zu niedrigen Markierungsindex verursachen.

Nebenher wurde festgestellt, wie hoch die Zahl markierter Leberstromazellen

der ungezählten Parenchymzellen vor. Da sich die Zellpopulation der Leberzellen im untersuchten Zeitraum stark ändert, ist dieses Bezugssystem ungeeignet für quantitative Aussagen, die auch nicht beabsichtigt waren. Es sollte lediglich festgestellt werden, zu welchem Zeitpunkt nach der Hepatektomie diese Zellen in die Phase gesteigerter DNS-Synthese treten.

C. VERSUCHE UND ERGEBNISSE

I. INKORPORATION VON P^{32} IN LEBER- UND NIERENEXPLANTATE VON UNBEHANDELTEN UND HYPOPHYSEKТОMIERTEN RATTEN

4 Wochen nach der Hypophysektomie wurden die Lebern und Nieren von hypophysektomierten Ratten und die entsprechenden Organe von Kontrolltieren explantiert.

Es handelte sich um männliche Sprague-Dawley-Ratten von ca. 180 g Gewicht, die bis zu ihrem Tod ad libidum gefüttert wurden.

Das Mass der Inkorporation von P^{32} in Leberexplantate nach 20-stündiger Rollerkultur zeigt Tabelle 1.

Aus der Tabelle ist einerseits die grosse biologische Streuung der Werte erkennbar, die eine statistische Auswertung der Ergebnisse hinfällig macht.

Andererseits ist doch die Tendenz ersichtlich, dass die explantierte Leber hypophysektomierter Ratten offenbar mehr Phosphat einbaut, als die unbehandelten Ratten.

Versuch Nr.	Leberexplantate	Leberexplantate	Abweichung B gegen A
	unbehandelter	hypophysektomierter	
	Ratten A.	Ratten B.	
H 27	344,9	298	- 14 %
H 29	87	114,6	+ 31 %
108/9	46	65	+ 41 %
111/2	71	77	+ 8 %
115/7	413	455	+ 10 %
113/4	57	84	+ 47 %
118/9	161	245	+ 51 %
121	326	360	+ 10 %
125/6	62,5	76	+ 21 %
128/9	23,3	18,5	- 21 %
131/2	61	81	+ 32 %
DH	150,5	102*	- 32 %
DT	31	50	+ 60 %
DU	33	30	- 8 %
DY	28	36	+ 28 %

TABELLE 1

Aufnahme von P^{32} durch Leberexplantate normaler und vier Wochen vorher hypophysektomierter Ratten. Rollerkultur 20 Std., Impulse/2 min./mg Explantatfeuchtgewicht.

Das Mass der Inkorporation von P^{32} in explantierte Niere nach 20-stündiger Rollerkultur zeigt Tabelle 2.

Versuch Nr.	Leberexplantate	Leberexplantate	Abweichung B gegen A
	unbehandelter	hypophysektomierter	
	Ratten A.	Ratten B.	
29	168,6	189,5	+ 12 %
H 52	212	259	+ 22 %
H 27	363,3	493,5	+ 36 %
H 43	379	583	+ 53 %

TABELLE 2

Aufnahme von P^{32} durch Nierenexplantate normaler und vier Wochen zuvor hypophysektomierter Ratten. Rollerkultur 20 Std., Impulse/2 min/mg Explantatfeuchtgewicht.

Aus dieser Tabelle ist erkennbar, dass auch die Niere hypophysektomierter Ratten offenbar in vitro vermehrt Phosphat inkorporiert.

II. INKORPORATION VON THYMIDIN-6-T (n) DURCH LEBEREXPLANTATE VON UNBEHANDELTEN UND VIER WOCHEN ZUVOR HYPOPHYSEKTOMIERTEN RATTEN

Die Versuchsbedingungen waren dieselben wie bei I. Es war lediglich P^{32} gegen Thymidin-6-T(n) ausgewechselt. Teilweise handelt es sich um dieselben Tiere wie in I.

Leberexplantate unbehandelter Ratten A.	Leberexplantate hypophysektomierter Ratten B.	Abweichung B gegen A
5226 $\pm$ 241	2060 $\pm$ 201	- 61 % P 0,001
4091 $\pm$ 194	2752 $\pm$ 244	- 33 % P 0,005
3023 $\pm$ 47	2361 $\pm$ 258	- 22 % P 0,02
3605 $\pm$ 242	2574 $\pm$ 279	- 29 % P 0,01
4919 $\pm$ 221	2546 $\pm$ 452	- 48 % P 0,005

TABELLE 3

Aufnahme von Thymidin-6-T(n) durch Leberexplantate normaler und vier Wochen zuvor hypophysektomierter Ratten.

Rollerkultur, 20 Std., Zerfälle/min/mg Explantattrockengewicht.

Mittelwerte aus je drei Versuchen mit je 18 Explantaten. Standardabweichung.

Die Versuche zeigen, dass Leberexplantate hypophysektomierter Ratten weniger Thymidin-6-T(n) aufnehmen als Leberexplantate unbehandelter Tiere.

III. INKORPORATION VON P^{32} IN DIE EXPLANTATE REGENERIERENDER LEBER VON NORMALEN UND HYPOPHYSEKTOMIERTEN RATTEN

Wie in den Versuchsgruppen I. und II. wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten von 180-200 g Körpergewicht verwendet. Die Hepatektomie wurde vier Wochen nach der Hypophysektomie ausgeführt. Die Kontrolltiere wurden gleichzeitig hepatektomiert.

Zu verschiedenen Zeiten nach der Hepatektomie wurden die Tiere durch Narkenschlag getötet und die regenerierende Leber explantiert. Tabelle 3 zeigt das Mass des Einbaus von P^{32} , ausgedrückt als Abweichung vom Wert des unbehandelten Kontrolltiers.

Zeitpunkt der Explantation nach Hepatektomie	Abweichung normaler regenerierender Leber gegen normale	Abweichung regenerierender Leber hypophysektomierter Ratten gegen normale
7 Std.	- 16 %	+ 10 %
12 Std.	+ 9 %	+ 98 %
18 Std.	+ 103 %	+ 170 %
24 Std.	+ 42 %	+ 221 %
25 Std.	+ 28 %	+ 28 %
31 Std.	+ 149 %	+ 193 %
38 Std.	+ 105 %	+ 125 %
46 Std.	+ 176 %	+ 315 %
48 Std.	+ 32 %	+ 75 %
48 Std.	+ 128 %	+ 136 %
48 Std.	+ 37 %	+ 101 %
57 Std.	+ 23 %	+ 27 %
65 Std.	+ 259 %	+ 259 %
96 Std.	+ 43 %	+ 55 %

TABELLE 4

Aufnahme von P^{32} durch Leberexplantate normaler und vier Wochen vorher hypophysektomierter Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Teilhepatektomie. Rollerkulturen 20 Std. Abweichung gegen den Wert der jeweils im selben Versuch angesetzten Leber eines unbehandelten Tieres.

Aus der Tabelle, in der wieder der hohe Grad biologischer Streuung vor allem

bei der Normalleber sichtbar wird, kann abgelesen werden, dass der Einbau von P^{32} in regenerierende Leber normaler Ratten sieben Stunden nach Hepatektomie noch gedämpft, zu allen später untersuchten Zeitpunkten aber stark gesteigert ist. Zweitens geht aus der Tabelle hervor, dass die regenerierende Leber hypophysektomierter Ratten noch mehr Phosphat inkorporiert als normale regenerierende Leber. Dies scheint für alle untersuchten Zeitpunkte nach Hepatektomie zu gelten.

IV. INKORPORATION VON THYMIDIN-6-T(n) IN DIE EXPLANTATE REGENERIERENDER LEBER VON NORMALEN UND HYPOPHYSEKTOMIERTEN RATTEN

Die Versuchsbedingungen waren weitgehend identisch mit denen von III. Es wurde lediglich das radioaktive Phosphat durch Thymidin ersetzt. Messung der eingebauten Thymidinmenge s. S.21. Das Ergebnis zeigt Abb.7 in graphischer Darstellung. Aus dieser geht hervor, dass sowohl die normale, regenerierende Leber wie die regenerierende Leber hypophysektomierter Ratten in vitro einen gegen die Norm gesteigerten Einbau von Thymidin zeigen, wenn sie zu bestimmten Zeiten nach Hepatektomie explantiert wurden. Während normale, regenerierende Leber die 18 Stunden nach Hepatektomie explantiert wurde, noch fast normale Werte, 24 Stunden nach Hepatektomie entnommen, schon eine sehr hohe Inkorporationsquote zeigt, lässt sich in der regenerierenden Leber hypophysektomierter Tiere eine Steigerung der Thymidinaufnahme erst nachweisen, wenn diese Lebern später als 24 Stunden nach Hepatektomie explantiert wurden.

Eine gesteigerte Thymidinaufnahme ist in den regenerierenden Lebern hypophysektomierter Ratten also später induziert als in normalen.

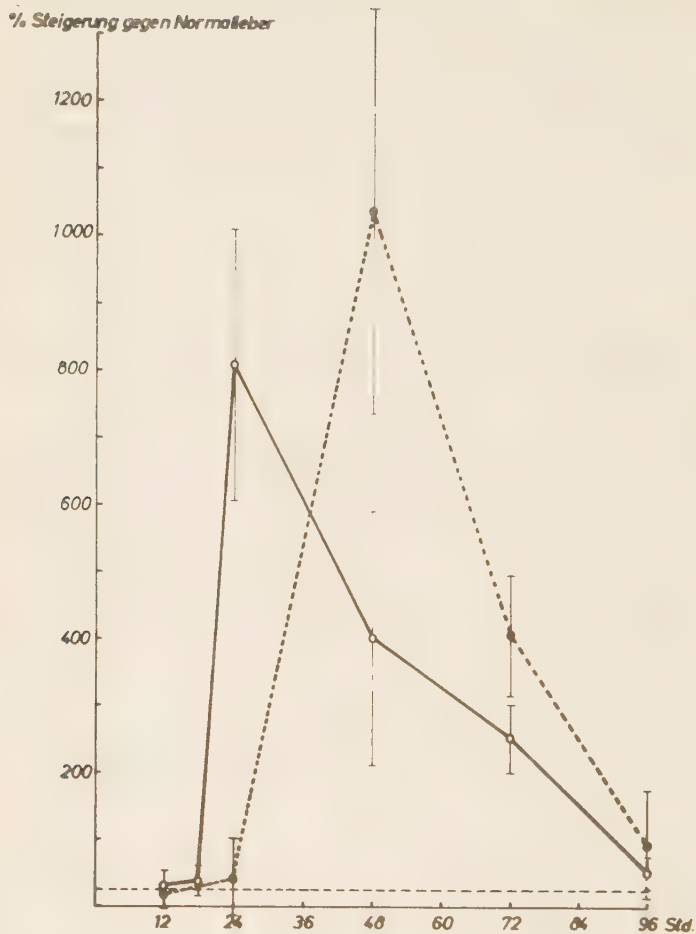


ABBILDUNG 7

Vergleich der Inkorporation von Thymidin-6-T(n) in regenerierende Leber normaler (○—○) und hypophysektomierter (●---●) Ratten während 20stündiger Rollerkulturen. Std. = Zeitintervall zwischen Teilhepatektomie und Explantation der Leber. Aktivität gemessen in Zerfällen/min/mg Trockengewicht. Mittelwerte und Standardabweichungen.

V. BESTIMMUNG DER THYMIDIN-6-T(n) INKORPORATION
REGENERIERENDER LEBER
NORMALER UND HYPOPHYSEKTOMIERTER RATTEN
IN VIVO
IN VERSCHIEDENEN INTERVALLEN NACH PARTIELLER HEPATEKTOMIE

Wie in den Versuchsgruppen III und IV wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten hypophysektomiert und vier Wochen danach nebst Kontrollen teilhepatektomiert.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Hepatektomie wurden den Versuchstieren $0,8 \mu\text{C}$ Thymidin-6-T(n) pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert. 60 Minuten danach wurden die Tiere durch Nackenschlag getötet, die Lebern entnommen und zwei verschiedenen Verfahren zugeführt.

Einmal wurden, wie S. 22 beschrieben, aus $0,5 \text{ g}$ der Leber die DNS extrahiert und ihr Gehalt an radioaktivem Thymidin bestimmt.

Zum andern wurde ein Teil der Leber dem, S. 22 beschriebenen, Verfahren der Autoradiographie zugeleitet.

Das Ergebnis der quantitativen Bestimmung der Thymidininkorporation in die DNS regenerierender Leber hypophysektomierter und normaler Ratten zeigt Abb. 8a.

Dazu gibt Abb. 8b die Zahl DNS-synthetisierender Zellen in den untersuchten Lebern wieder.

Aus beiden Darstellungen ist ersichtlich, dass Beginn und Maximum der ersten DNS-Synthesewelle in regenerierender Leber bei der hypophysektomierten Ratte gegenüber dem normalen Verlauf um ca. 15 Stunden verspätet sind.

Die Zahl der DNS-synthetisierenden Zellen ist in beiden Maxima annähernd gleich.

Dagegen liegt der maximale Wert für die eingebaute Thymidinmenge bei der hypophysektomierten Ratte beträchtlich unter dem Maximalwert der normalen Ratten.

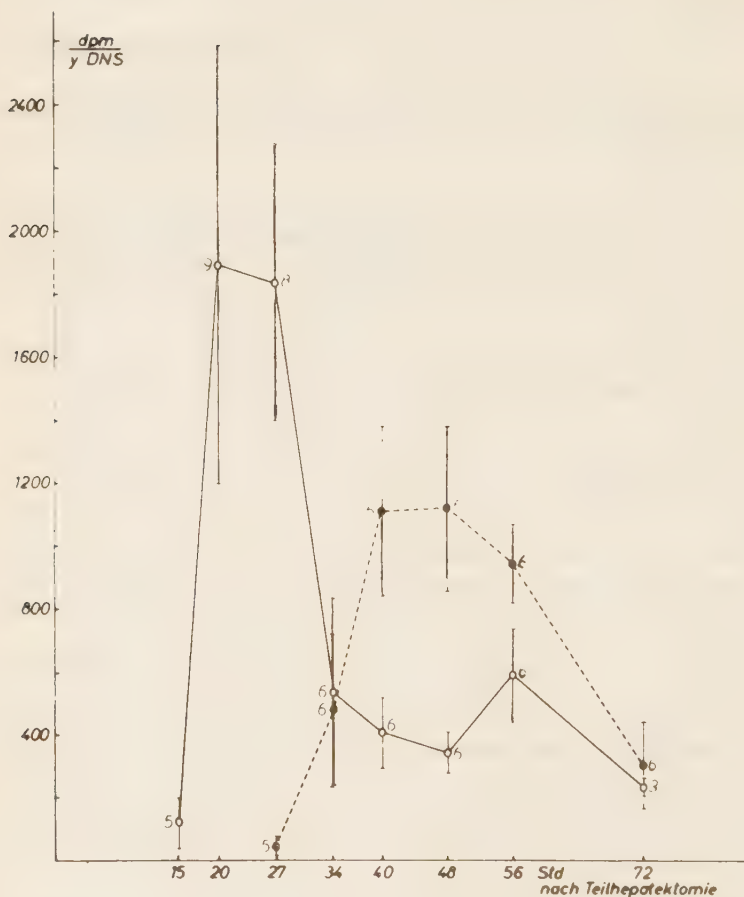


ABBILDUNG 8 a

DNS-Synthese bei regenerierender Leber normaler (○—○) und hypophysek-
tomierter (●-----●) Ratten in verschiedenen Intervallen nach partieller Hepa-
tektomie. Abszisse: Zeitpunkt der Injektion von 0,8 μ C Thymidin-6-T(n)
(spez. Aktiv. 1,9 C/mM) pro g KG. 60 min. danach Entnahme der Leber.
Extraktion der DNS. Ordinate: Zerfälle/min/ μ g DNS. Mittelwerte aus einer
jeweils an den Kurvenpunkten angegebenen Zahl von Versuchstieren. Vertikalen
= Standardabweichungen.



ABBILDUNG 8b

Mittelwerte aus einer an den Kurvenpunkten angegebenen Zahl von Versuchstieren, Standardabweichungen.

Autoradiographischer Vergleich der DNS-Syntheseaktivität regenerierender Leber normaler (o—o) und hypophysectomierter (●-----●) Ratten in verschiedenen zeitlichen Abständen nach partieller Hepatektomie. Bestimmung der Zahl der markierten Zellen pro 10 000 Leberparenchymzellen (Ordinate). Abszisse Zeitpunkt der Injektion von 0,8 μ C Thymidin-6-T(n) g KG (spez. Akt. 1,9 C/mM) nach Teilhepatektomie. 60 min. danach Entnahme der Leber, Fixierung, Überschichten von Paraffinschnitten (5 μ) mit Emulsion K 2 (ILFORD). Exposition 21 Tage, Haemalaunfärbung.

VI. ZEITLICHER BEGINN DER DNS-SYNTHESEWELLE

NACH PARTIELLER HEPATEKTOMIE IN DEN LEBERSTROMAZELLEN

Im selben Zählgang, in dem der Markierungsindex der Leberparenchymzellen bestimmt wurde, wurden alle markierten Zellkerne der oben genannten Zellgruppe, die mit den 10 000 gezählten Parenchymzellen im Blickfeld des Mikroskops erschienen, notiert.

Die so erhaltenen Zahlen sind für quantitative Aussagen ungeeignet, da sich die Beziehung von Parenchymzellzahl zur Zahl der Stromazellen während des Versuchs stark ändert.

Es kann aber doch der Beginn der DNS-Synthesewelle in der genannten Zellgruppe erkannt werden. Lediglich aus Gründen der Anschaulichkeit wurden in den beiden folgenden Abbildungen jeweils die graphische Darstellung des Verhaltens der Parenchymzellen mit der des Verhaltens der Stromazellen zusammengestellt.

Aus diesen Abbildungen 9 und 10 darf lediglich geschlossen werden, dass die Stromazellen in der regenerierenden Leber hypophysektomierter Ratten fast zur selben Zeit in die Phase verstärkter DNS-Synthese eintreten, wie in normaler regenerierender Leber.

Über das Ausmass der DNS-Synthese kann keine Aussage gemacht werden.

(Die dazugehörenden Abbildungen siehe Seite 34 und 35).

VII. AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG DES HODENS

HYPOPHYSEKTOMIERTER, TEILHEPATEKTOMIERTER RATTEN

Von den Ratten aus Versuch V wurden auch die Hoden histologisch und autoradiographisch untersucht. Die Hoden unbehandelter und normaler, teilhepatektomierter Ratten zeigten histologisch erwartungsgemäss ein normales Bild:

In allen Tubulusquerschnitten fanden sich als Zeichen der Spermiogenese, von basal zum Lumen hin, massenhaft Spermatogonien, Sertolizellen, Spermatozyten I und II und schliesslich Spermiden, von Tubulusquerschnitt zu Tubulusquerschnitt in wechselnden Reifestadien bis zu reifen Spermien.

Die Hoden der hypophysektomierten Tiere zeigten vier Wochen nach der Hypophysektomie dagegen ein ganz anderes Bild:

Entsprechend der erheblichen Abnahme von Gewicht und Volumen des Hodens, die zur Kontrolle des Erfolgs der Hypophysektomie diente und dort beschrieben ist, fand sich eine Schrumpfung der Kanälchenquerschnitte auf weniger als die

Hälfte der bei den Kontrollen gefundenen Werte. Die Tubuluslumina waren optisch leer, die Samenkanälchen nur noch von einer ein- bis maximal dreischichtigen Zellreihe ausgekleidet, die von Sertolizellen, Spermatogonien und vereinzelt Spermatocyten I gebildet wurde. Alle Tubulusquerschnitte eines Hodens zeigten einheitlich dasselbe Bild. Es fanden sich keine einzige Spermie noch Spermiden.

Die Zahl der Leydig'schen Zwischenzellen schien nicht vermindert, doch zeigten sie die von MUSCHKE (45) und TONUTTI (68) beschriebenen Veränderungen im Sinne einer Verringerung von Zell- und Kernvolumen und grobfleckiger Anordnung des Chromatins.

Diese Befunde stimmen mit anderen Beschreibungen der Hodenatrophie (45, 68, 42) überein. Sie schliessen eine Spermiogenese in den Hoden der hypophysektomierten Ratten zum Zeitpunkt der Hepatektomie aus.

Die autoradiographische Untersuchung dieser Hoden zu bestimmten Zeiten nach der Hepatektomie ergab ein unerwartetes Ergebnis.

Bei den Hoden von sieben normalen, unbehandelten Kontrolltieren fanden sich nur in den Hoden eines Tieres in wenigen Tubulusquerschnitten schwach markierte Spermatogonien (Abb. 11). Bei den anderen Tieren liessen sich zwar in der Leber -dem normalen Markierungsindex entsprechend- ganz vereinzelt markierte Zellen nachweisen, nicht aber in den Hoden.

Die Hoden normaler, teilhepatektomierter Ratten zeigten teilweise schon 27 Std. nach der Hepatektomie, alle aber 32 Stunden nach der Hepatektomie in vielen Tubulusquerschnitten viele deutlich markierte Spermatogonien (Abb. 12). In den Hoden der hypophysektomierten Tiere, die 34 Stunden nach Hepatektomie untersucht wurden, fanden sich in der Mehrheit der Tubulusquerschnitte massenhaft markierte Spermatogonien (Abb. 13 und 14).

Eine quantitative Aussage über das Ausmass der DNS-Synthese in den untersuchten Hoden ist allerdings nicht möglich, da die Hoden normaler und hypophysektomierter Tiere verschieden und damit nicht direkt vergleichbar sind. Während nämlich in den Hoden nicht hypophysektomierter Tiere sich von Tubulusquerschnitt zu Tubulusquerschnitt verschiedene Stadien der Spermiogenese finden, zeigen die Hoden der hypophysektomierten Ratten in jedem angeschnittenen Samenkanälchen das gleiche Bild. Ausserdem ist die Spermatogonienzahl pro Tubulusquerschnitt in den Hoden nicht hypophysektomierter Ratten wesentlich grösser als in denen der hypophysektomierten. Es wurde deshalb auf die Bestimmung der Markierungsindices verzichtet. Die beigefügten Abbildungen (11-14) demonstrieren diesen Befund.

Es ergibt sich, dass

markierte Zellen/10 000 Leberzellen

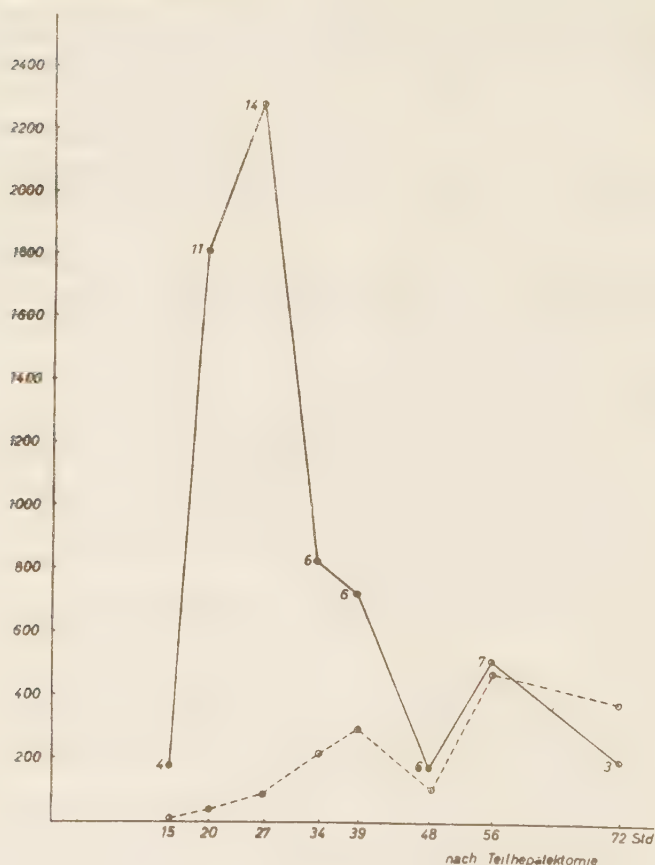


ABBILDUNG 9

Autoradiographischer Vergleich der Syntheseaktivität von Leberparenchymzellen (●—●) und Stromazellen (Endothel- und Gallengangszellen) (●---●) in normaler regenerierender Leber in verschiedenen zeitlichen Abständen nach partieller Hepatektomie.

Bestimmung der Zahl der markierten Zellen pro 10 000 Leberparenchymzellen (Ordinate). Abszisse = Zeitpunkt der Injektion von $0,8 \mu\text{C}$ Thymidin- $6\text{-T}(\text{n})$ pro g KG. Mittelwerte aus einer an den Kurvenpunkten angegebenen Zahl von Versuchstieren.

markierte Zellen/10 000 Leberzellen

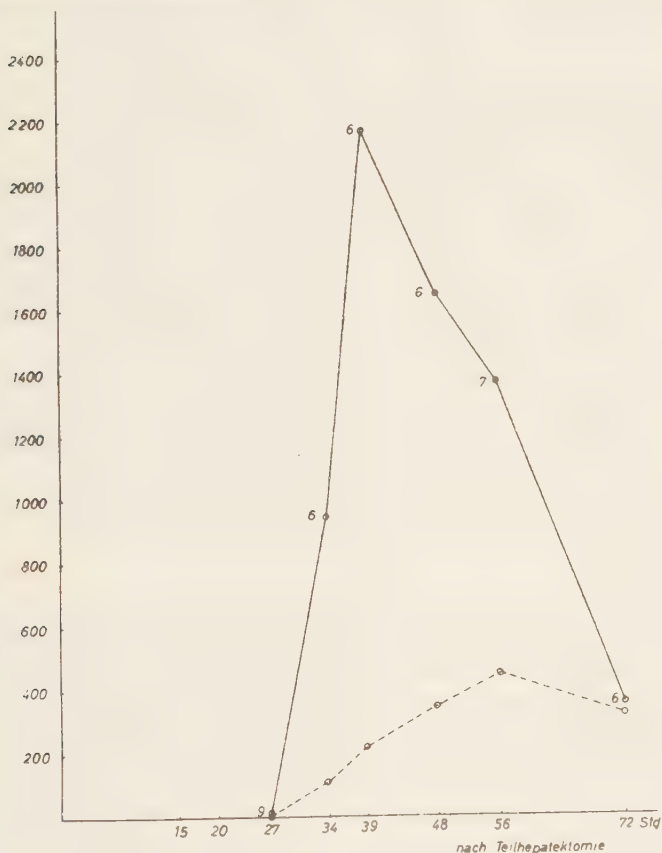


ABBILDUNG 10

Autoradiographischer Vergleich der DNS-Syntheseaktivität von Leberparenchymzellen (○—○) und Stromazellen (Endothel- und Gallengangszellen) (●---●) in regenerierender Leber hypophysektomierter Ratten in verschiedenen zeitlichen Abständen nach partieller Hepatektomie.

Bestimmung der markierten Zellen pro 10 000 Leberparenchymzellen (Ordinate). Abszisse = Zeitpunkt der Injektion von $0,8 \mu\text{C}$ Thymidin- $6\text{-T}(n)$ pro g KG. Mittelwerte aus einer an den Kurvenpunkten angegebenen Zahl von Versuchstieren.

1. der Teilhepatektomie bei normalen Ratten eine Steigerung der DNS-Synthese in den Spermatogonien folgt, und dass
2. die Spermatogonien in den atrophischen Hoden hypophysektomierter Ratten stark DNS synthetisieren, wenn die Tiere partiell hepatektomiert werden.

Die folgenden Tabellen sollen die einzelnen Versuchsergebnisse, sowie die Möglichkeit eines wellenförmigen Verlaufs der DNS-Syntheseaktivität im Hoden nach Teilhepatektomie deutlich machen. Aus den oben genannten Gründen, die einen Vergleich der Hoden in Zahlen nicht zulassen, wurden lediglich vier grob orientierende Gruppen gebildet und die einzelnen Präparate diesen Gruppen zugeordnet.

- Gruppe 0: Im ganzen Hodenquerschnitt keine markierte Spermatogonie.
 Gruppe 1: Im ganzen Hodenquerschnitt nur einige markierte Spermatogonien.
 Gruppe 2: In mehreren Tubuli des Hodenquerschnitts viele markierte Spermatogonien.
 Gruppe 3: In mehreren Tubuli des Hodenquerschnitts sehr viele markierte Spermatogonien.

Die drei Gruppen entsprechen den folgenden Fotos derart, dass Abb. 11 der Gruppe 1 angehört. Abb. 12 ist der Gruppe 2 zuzuordnen. Abb. 13 und 14 entsprechen Gruppe 3.

Da der Reichtum an markierten Zellen beim Hoden hypophysektomierter Ratten wahrscheinlich nur relativ, durch die Zellarmut dieser Hoden vorgetäuscht ist, dürften sich Gruppe 2 der normalen Ratten und Gruppe 3 der hypophysektomierten entsprechen. Es wäre da zu folgern, dass die DNS-Synthese in den Spermatogonien hypophysektomierter Tiere nach Teilhepatektomie in ähnlichem Ausmass abläuft, wie bei normalen teilhepatektomierten Tieren.

Stunden nach Hepatektomie	27	34	39	56	72	27	34	39	56	72
Gruppe 3	2	/	/	/	/	2	5	6	2	1
Gruppe 2	2	5	4	/	2	1	1	/	/	4
Gruppe 1	2	1	2	4	1	3	/	/	4	1
Gruppe 0	2	/	/	3	/	2	/	/	1	/

TABELLE 5

Hoden nur teilhepatektomierter Ratten

Hoden hypophysektomierter teilhepatektomierter Tiere.

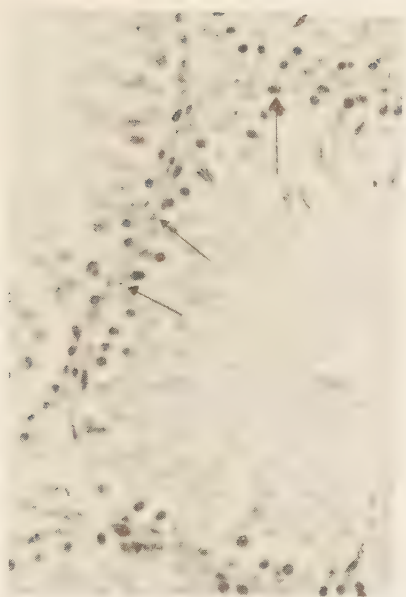


ABBILDUNG 11

Autoradiographische Darstellung eines normalen Rattenhodens. Die Pfeile weisen auf die wenigen, schwach markierten Spermatogonien, die sich in diesem Hoden finden liessen.

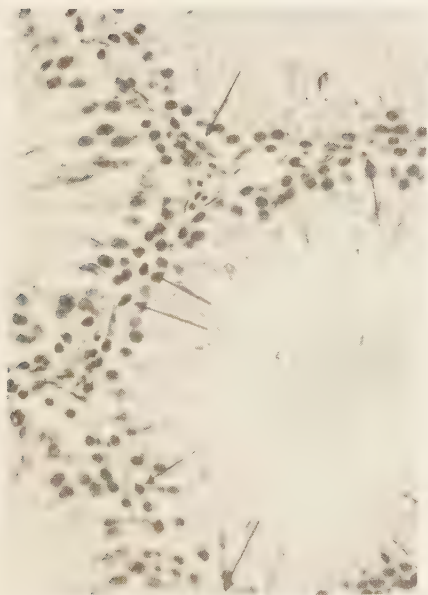


ABBILDUNG 12

Autoradiographische Darstellung des Hodens einer normalen, teilhepatektomierten Ratte, 34 Stunden nach der Hepatektomie. Die Pfeile bezeichnen markierte Spermatogonien.



ABBILDUNG 13



ABBILDUNG 14

Abb. 13 und 14 sind Autoradiogramme von Hoden hypophysektomierter Ratten, 34 Stunden nach Teilhepatektomie. Neben den Zeichen der Atrophie (kleiner Tubulusquerschnitt, leeres Lumen, keine Spermiden ect.) finden sich die Mehrzahl der Spermatogonien markiert. Die Pfeile weisen auf einige der markierten Zellen.

Die Zahlen in den Kästchen bedeuten die Anzahl der in diese Gruppen fallenden Tiere zum betreffenden Zeitpunkt nach Teilhepatektomie. Die Bedeutung der Gruppen ist oben im Text erklärt. Von den Kontrolltieren gehörten 6 der Gruppen 0, 1 der Gruppe 1 an.

D. DISKUSSION

I. ZUSAMMENSTELLUNG DER WICHTIGSTEN BISHER ZUR LEBERREGENERATION BEKANNTEN FAKTEN

1. Zeitlicher Ablauf

Der zeitliche Ablauf der Leberregeneration wurde mit verschiedenen Untersuchungsmethoden verfolgt. Die Messung des Lebergewichts der verbleibenden Leber nach Teilhepatektomie ergab, dass binnen drei Tagen der grösste Teil des entfernten Lebergewebes ersetzt wird (29, 18). Ein genauerer Einblick in diesen Vorgang konnte durch Mitosezählung gewonnen werden (70, 13, 9, 25, 27, 47). Danach ergab sich in guter Übereinstimmung der meisten Autoren, dass vier Stunden nach Teilhepatektomie die Mitoserate in der Restleber geringfügig ansteigt und zwölf Stunden nach der Operation auf normale oder subnormale Werte abgesunken ist. Eine gesteigerte Mitoseaktivität in der verbleibenden Restleber beginnt dann zwischen 20 und 24 Stunden nach Teilhepatektomie und erreicht in steilem Anstieg zwischen 27 und 36 Stunden nach Hepatektomie ein Maximum, dessen Höhe zwischen 30 und 40 Mitosen pro 100 Zellen angegeben wird. 48 Stunden nach der Hepatektomie liegt der Mitoseindex nur mehr wenig über dem von normaler Leber. Nach etwa drei Wochen ist er gänzlich auf normale Werte abgesunken. CATER (13) gibt einen wellenförmigen Verlauf der Mitoseaktivität mit einem zweiten, niedrigeren Maximum 45 Std. nach Hepatektomie an.

Untersucher, die den Einbau von radioaktivem Phosphat in vivo in die Restleber zu verschiedenen Zeiten nach Teilhepatektomie beobachteten (13, 46, 31), fanden in Übereinstimmung mit jenen, die den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin (25, 7) bzw. Orotsäure- C^{14} unter gleichen Bedingungen untersuchten, dass die DNS-Synthese der regenerierenden Rattenleber zwischen 12 und 20 Stunden nach Teilhepatektomie steil ansteigt und zwischen 20 und 27 Stunden nach

der Operation ein Maximum erreicht. Diesem folgt ein steiler Abfall der DNS-Syntheseaktivität, der aber nach der Beobachtung OEHLERTS (47) weniger steil ist als jener der Mitosen, woraus OEHLERT (47) auf ein Andauern von Ploidierungsprozessen schloss. OEHLERT (47) und HECHT (26) beschrieben einen zweigipfligen Verlauf dieser Kurve. Übereinstimmend wird von allen Autoren berichtet, dass 72 Stunden nach der Teilhepatektomie die DNS-Synthese in der Restleber zwar noch signifikant, aber nur mehr wenig über normalen Werten liegt.

Autoradiographische Untersuchungen (47, 25) ergaben, dass zum Zeitpunkt maximaler DNS-Synthese zwischen 30 und 40 % aller Leberparenchymzellen DNS synthetisieren.

In den gleichen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Stromazellen (Endothelien und Gallengangszellen) wesentlich später nach der Teilhepatektomie mit der Steigerung der DNS-Synthese beginnen als die Parenchymzellen. Der zeitliche Unterschied zwischen dem Anstieg der DNS-Synthese in Parenchymzellen und Zellen der genannten Gruppe liegt zwischen 8 und 12 Stunden (47, 25).

Neben dem zeitlichen Ablauf wurde auch die topographische Verteilung der DNS-synthetisierenden, bzw. sich teilenden Zellen untersucht. Übereinstimmend berichten viele der genannten Autoren, dass die DNS-Synthese in den periportal angeordneten Zellen beginnt und erst im weiteren Verlauf des Regenerationsvorgangs zum Läppchenzentrum hin fortschreitet. In gleicher Verteilung findet sich dabei Vakuolisierung des Cytoplasmas mit Basophilieschwund (47). Für die Stromazellen liess sich bezüglich der DNS-Synthese keine besondere topographische Verteilung nachweisen (47).

ATERMAN (4) beschreibt auch an den von Kupffer'schen Sternzellen histologische Veränderungen, die eine Stoffwechselbelastung dieser Zellen nach Hepatektomie wahrscheinlich machen sollen.

2. Steuerung

Bei der Suche nach dem Steuermechanismus der Leberregeneration wurden zunächst mehrere Faktoren gefunden, die das Ausmass der Regeneration oder ihren zeitlichen Ablauf beeinflussen. Von verschiedenen Autoren (51, 29, 18) wird von einer Verzögerung und Verringerung der Leberregeneration bei hungernden Tieren berichtet. Andere (8) zeigten, dass durch eine bestimmte Diät optimale Re-

generation erzielt werden kann. Die Ernährung kann also als ein modulierender Faktor der Leberregeneration angesehen werden.

Als weiterer Faktor liess sich das Ausmass des portalen Blutflusses ermitteln (41, 63). Die künstliche Verringerung des portalen Blutflusses hatte eine Leberatrophie zur Folge (59). Aber auch diese atrophische Leber hat die Fähigkeit zur Regeneration, wie WEINBREN (69) zeigen konnte.

Auch für mehrere Hormone wurde eine Wirkung auf die Leberregeneration nachgewiesen. SWANN (65), der die Befunde mehrerer Autoren zusammenfasst, berichtet von einer Stimulierung durch Insulin, sowie in vitro durch männliche und weibliche Sexualhormone. Eine Hemmung des Wachstums wurde übereinstimmend nach Gaben von Adrenalin und Corticosteroiden berichtet, während die Angaben über die Wirkungen von STH und Thyroxin stark differieren.

Befunde über die wachstumsstimulierende Wirkung von Insulin in Gegenwart von Glukose stammen von BULLOUGH (11). Über die hemmende Wirkung von Cortison wird ausführlich von ROBERTS (58), PEREZ-TAMAY (51) und HEMINGWAY (27) berichtet. Bei der Untersuchung des Einflusses des Schilddrüsenhormons fanden ADLE (2) und MANGALIK (40), dass die Leberregeneration durch Thiouracil oder Thyreoidektomie vermindert, durch Thyroxin verbessert wird.

FOGELMAN (17) nimmt dagegen auf Grund seiner Versuche an, dass Thiouracil die Leberregeneration fördert. LEATHEM (35) zeigte Veränderungen des Lebergewichts und Proteingehalts der Leber nach Anwendung von Thiouracil.

Eine Reihe von Untersuchern beschäftigte sich mit der Untersuchung des Einflusses der Hypophyse bzw. deren Hormone auf die Leberregeneration. POST u.a. (53) zeigten eine Reduktion der Lebergesamtmasse nach Hypophysektomie. DI STEFANO (62) fand nach Hypophysektomie in der Rattenleber eine Verschiebung des Verhältnisses diploider zu tetraploiden Zellkernen zu den diploiden hin, die sich durch Gabe von STH rückgängig machen liess. HIGGINS (29), CANZANELLI (12) und FRANSEEN (18) fanden übereinstimmend, dass die Leberregeneration in hypophysektomierten Ratten zwar abläuft, jedoch in geringerem Ausmass, als bei normalen Ratten.

ASTERABADI (3) konnte allerdings bei Hunden keine Veränderung im Ablauf der Leberregeneration durch Hypophysektomie nachweisen. HEMINGWAY und CATER (27) fanden, dass sich die verringerte Regeneration der Leber hypophysektomierter Ratten durch Gaben von STH oder Hypophysenextrakt normalisieren liess. Die Substitution hypophysektomierter Ratten mit STH und Cortison, bzw. mit Hypophysenextrakt und Cortison, ergab in ihren Versuchen eine Steigerung der Regenerationsvorgänge im Vergleich zu normalen Kontrolltieren. Eine Substitu-

tion mit Cortison allein hatte eine Depression des Regenerationsablaufs zur Folge.

WEINBREN (70), der die Leberregeneration nach Hypophysektomie durch Zählung der Mitosen verfolgte, konnte zeigen, dass die gesteigerte Mitoseaktivität bei hypophysektomierten Tieren später als bei normalen Tieren nach Hepatektomie einsetzt. Das Mitosemaximum hypophysektomierter Tiere tritt nach seiner Untersuchung etwa 30 Std. später ein als bei normalen Ratten, ist aber ungefähr gleich hoch. Es muss hervorgehoben werden, dass es sich bei allen bisher genannten Faktoren lediglich um modulierende handelt. Sie vermögen es nicht, allein eine Leberregeneration zu induzieren. Dass aber im Blut teilhepatektomierter Ratten ein spezifisch das Leberwachstum stimulierender Faktor kreist, konnten CHRISTENSEN (14), BUCHER (10) und WENNEKER (73) in Parabioseversuchen nachweisen. FRIEDRICH-FRESKA und ZAKI (19) konnten zeigen, dass die einmalige Injektion von Serum partiell hepatektomierter Ratten eine signifikante Steigerung der Mitoseaktivität zur Folge hat. Dabei war nur das zwischen 24 und 72 Stunden nach Hepatektomie entnommene Serum wirksam. WRBA und RABES (76,80) fanden, dass das zwischen 24 und 72 Stunden nach Teilhepatektomie entnommene Rattenserum den Phosphateinbau in explantierter Leber steigert. Es sei hier nur am Rande erwähnt, dass dieses Serum das Wachstum verschiedener Tumorsuspensionen *in vitro* hemmt (55,77,80). PASCHKIS (48) konnte dagegen zeigen, dass manche Tumoren auf teilhepatektomierten Tieren schneller wuchsen als auf normalen; andere Tumoren wurden dagegen gehemmt. GLINOS und GEY (23) fanden, dass das Serum teilhepatektomierter Ratten das Wachstum von Fibroblastenkulturen stimuliert, während andere Autoren nur eine streng organspezifische Wirkung auf die Leber fanden. Lediglich PASCHKIS, GODDARD und ADIBI (49) berichten noch vom Wachstum anderer Gewebe in Ratten mit regenerierender Leber.

WRBA (82) zeigte, dass das Serum teilhepatektomierter Ratten auch explantierte Mäuseleber zu einem erhöhten Phosphateinbau stimuliert.

Während die geschilderten Wirkungen des Serums teilhepatektomierter Ratten wissenschaftlich gesichert sind, liegen Herkunft, Wesen und Wirkungsweise des stimulierenden Faktors noch weitgehend im Dunkel.

Die Versuche von McJUNKIN und BREUHAUS (44), die eine erhöhte Mitoseaktivität der Restleber nach Teilhepatektomie ergaben, wenn nekrotisches Lebergewebe in der Bauchhöhle zurückblieb, waren Anlass für eine Fülle von Arbeiten mit Leberhomogenaten. BLOMQUIST (6), TEIR (67) und WILSON (74) berichten übereinstimmend von einem Mitoseanstieg in normaler Leber nach Injektion von Leberhomogenat.

WALKER (43) und KELLY und JONAS (32) durch Leberhomogenat und durch Fraktion der DNS-syntheseaktivität in verschiedenen Organen allein, fanden ähnlichen Anstieg (67, 43) diesen Effekt nur in der Leber.

Es muss hier ausdrücklich festgestellt werden, dass noch nicht bewiesen wurde, dass die in Leberhomogenaten nachgewiesenen Wachstumsstimulanten identisch mit jenem im Serum teilhepatektomierter Ratten sind, so dass es nicht zulässig ist, die entsprechenden Befunde in einen Topf zu werfen.

Dies ist auch bei Versuchen zur Aufklärung der Struktur des stimulierenden Faktors zu beachten. Hier kommen MARSHAK und WALKER (43) durch ihre Arbeit mit Leberhomogenat zu der Vermutung, dass es sich um ein Chromatin handelt. Sie fanden nach intravenöser Applikation von, aus Lebern gewonnenem Chromatin, einen Mitoseanstieg in der Leber. Auch die Arbeit von KELLY und JONAS (32) deutet darauf hin, dass es sich bei dem gesuchten Stoff um ein Desoxyribonucleoprotein handelt. PASCHKIS u.a. (50) stellten fest, dass die Wirksamkeit von Leberhomogenat durch Kochen zerstört wird, was auch TEIR und RAVANTI (67) beschreiben. Die genannten Autoren stellten auch fest, dass nach Dialyse beide Fraktionen unwirksam sind, ihre Wirksamkeit aber zurückerlangen, wenn sie wieder zusammengegeben werden. Es wurde daraus auf das Zusammenwirken einer grossmolekularen und einer kleinemolekularen Substanz geschlossen, von denen mindestens eine durch Kochen zerstört wird. Dagegen wies WRBA (82) Thermostabilität des fraglichen Faktors aus Leberhomogenat nach.

Mit dem Serum befasst sich die Arbeit von GLINOS (24). In ihr wird nachgewiesen, dass einfache Plasmaverdünnung, wie sie auch in teilhepatektomierten Tieren zu finden ist, in vitro einen Mitoseanstieg in normaler Leber verursacht.

In ähnlicher Weise wirkte das Serum hepatektomierter Tiere, das mit wenig Normalserum gemischt war. Hohe Normalserumkonzentrationen hatten eine hemmende Wirkung (23).

Auch in den Arbeiten von SMYTHE und MOORE (61), STICH und FLORIAN (64) und KOHN (33) wird nachgewiesen, dass das Serum normaler Ratten einen hemmenden Effekt auf das Leberwachstum hat.

Zwischen diesen Befunden kann man eine Verbindung herstellen, wenn man annimmt, dass normalerweise ein Gleichgewicht zwischen hemmenden Faktoren im Blut und stimulierenden im Gewebe herrscht. Eine Störung des Gleichgewichts im Sinne einer Wachstumsstimulation ist nun auf zweierlei Weise möglich;

einmal durch Verdünnung des Hemmfaktors (Beispiel: Hepatektomie, unter der Voraussetzung, dass der Faktor laufend von der Leber produziert und anderswo abgebaut wird);

zum andern durch Vermehrung des stimulierenden Faktors (Beispiel: Injektion von Leberhomogenat).

Auf die Frage nach der Spezifität soll im Folgenden, beim Abschnitt Hepatektomie und Spermiogenese etwas eingegangen werden.

II. BESPRECHUNG DER BEFUNDE

Als erster Befund wurde beschrieben, dass der Einbau von P^{32} in Leberexplantate hypophysektomierter Tiere in vitro gesteigert ist. Die als weiterer Befund mitgeteilte Tatsache, dass auch die Phosphataufnahme explantierter Niere hypophysektomierter Ratten gegenüber jener von normalen Tieren gesteigert ist, zeigt, dass es sich hier nicht um einen spezifisch auf die Leber gerichteten Effekt handelt.

Da man nach der Arbeit von WRBA und RABES (81) den Umsatz von P^{32} als Massstab für die Stoffwechselintensität explantierter Organe ansehen kann, besteht nun die Frage, ob es sich hier unter der Wirkung der im Kulturmedium enthaltenen Hormone (aus Embryonalextrakt und Kälberserum) um einen gesteigerten Nachholstoffwechsel jener Gewebe handelt, die diese Hormone vorher entbehren mussten, oder ob es sich um das Fortbestehen eines in vivo induzierten Stoffwechsels handelt. Zwar kann aus den Arbeiten von WRBA und RABES (79, 78) geschlossen werden, dass in vivo induzierte Wachstums- und Stoffwechselvorgänge in vitro eine Zeitlang fortgeführt werden, andererseits werden ja mit der Explantationsmethode die Wirkungen verschiedener Zusätze zum Nährmedium auf Stoffwechsel und Wachstum geprüft, so dass die beobachtete Steigerung der Inkorporation von P^{32} sowohl in vivo, als auch in vitro induziert worden sein kann.

GESCHWIND, LI und EVANS (22) konnten zeigen, dass die Phosphataufnahme in Leber, Niere und Thymus hypophysektomierter Tiere in vivo kurzfristig gesteigert, in Muskel und Knochen vermindert ist. Sie fanden gleichzeitig eine verlangsamte Abnahme der Konzentration anorganischen P^{32} im Plasma und machten aus diesen Beobachtungen wahrscheinlich, dass der gesteigerte Gehalt an P^{32} von Leber, Niere und Thymus nur den hohen P^{32} -Gehalt des Plasmas in diesen gut durchbluteten Organen reflektiert. Lediglich in der Leber fanden diese Autoren auch noch nach Absinken des Plasmaspiegels einen höheren Gehalt an P^{32} als in den Kontrollebern.

Aus dieser Arbeit ist nur sicher erkennbar, dass nach Hypophysektomie die Phosphataufnahme von Knochen und Muskel verringert ist. Eine gesteigerte Inkorporation in andere Organe bleibt fraglich. GESCHWIND, LI und EVANS konnten in einer anderen Arbeit (20) zeigen, dass in Lebern hypophysektomierter Ratten weniger RNS enthalten und die RNS-Phosphorkonzentration niedriger ist als bei normalen Tieren. Die Behandlung mit STH ergab ein Ansteigen der RNS-Phosphorkonzentration auf normale Werte. Auch die Untersuchung der Phospholipide (21) ergab, dass die Hypophysektomie den Umsatz von Leberphospholipiden senkt, während Wachstumshormon ein Ansteigen des Phospholipidumsatzes in hypophysektomierten und normalen Ratten zur Folge hatte. LI und EVANS (38) zeigten zudem, dass die alkalische Phosphatase nach Hypophysektomie ebenso wie der Gehalt an anorganischen Phosphat im Blut vermindert ist.

Aus diesen in vivo erhobenen Befunden darf geschlossen werden, dass die in vitro gefundene Steigerung des Einbaus von P^{32} in Leber und Niere hypophysektomierter Tiere nicht schon in vivo bestand, sondern erst durch das Nährmedium verursacht wurde. Dies muss auch für die an explantierter regenerierender Leber erhobenen Befunde festgehalten werden.

Interessanterweise baut dieselbe explantierte Leber hypophysektomierter Ratten, die vermehrt Phosphat aufnimmt, weniger Thymidin ein als normale Leber. Es kann daraus geschlossen werden, dass es sich bei der durch das Nährmedium induzierten Stoffwechselsteigerung nicht um eine Wachstumsstimulation im Sinne einer echten Zellvermehrung handelt. Die DNS-Synthese bzw. Zellvermehrung bleibt bei der normalen Leber hypophysektomierter Ratten auch in vitro unter der Norm.

Dies ändert sich bei der Explantation regenerierender Leber, hier finden wir bei der Untersuchung des Phosphateinbaus zunächst einmal, in Übereinstimmung zu den zahlreicheren Untersuchungen von RABES (54), dass kurze Zeit nach der Teilhepatektomie explantierte Lebern eine verringerte Phosphataufnahme zeigen. Erst 12 Std. nach Hepatektomie entnommene Lebern sind schon zu höherer Phosphataufnahme stimuliert. Diese Stimulierung ist dann zu allen Zeitpunkten, die später als 12 Std. nach Teilhepatektomie untersucht wurden, nachzuweisen.

Die regenerierende Leber hypophysektomierter Tiere liegt nun zu allen untersuchten Zeitpunkten im Ausmass ihrer Phosphataufnahme über der normalen regenerierenden Leber.

Das heisst auch, dass die Leber hypophysektomierter Ratten zum gleichen Zeitpunkt nach Teilhepatektomie wie die normale einen erhöhten Phosphateinbau zeigt.

Für die Tatsache, dass das Ausmass der Steigerung des Phosphateinbaus in die regenerierende Leber hypophysektomierter Ratten grösser ist, als bei normalen Ratten, gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten.

Einmal muss festgestellt werden, dass gleiche Explantatgewichte von Lebern normaler und hypophysektomierter Ratten nur mit Einschränkung in ihrer Stoffwechselleistung verglichen werden dürfen. Wie das histologische Bild zeigt, sind in der an Speicherstoffen verarmten Leber hypophysektomierter Ratten die Parenchymzellen wesentlich kleiner und damit dichter gepackt als bei normalen Lebern. Als Folge ergeben sich bei gleichen Gewichten -nur diese sind für die Explantate bestimmbar- für die Leber hypophysektomierter Ratten eine weit höhere Zahl von Zellen bzw. synthesesfähiger Einheiten als für die Leber normaler Ratten. Es könnte nun sein, dass die einzelne Leberzelle der hypophysektomierten Ratte weniger Phosphat aufnimmt als die Leberzelle einer normalen, dass aber bei Gewichtvergleich durch die zahlenmässige Überlegenheit an Zellen ein erhöhter Phosphateinbau in die Leber hypophysektomierter Tiere nur vorgetäuscht wird.

Die zweite Möglichkeit der Erklärung ist die, dass die Leber hypophysektomierter Tiere im Nährmedium, das Hypophysenhormone enthält, tatsächlich in einer Art Nachholstoffwechsel vermehrt Phosphat einbaut.

Unabhängig davon, welche der genannten Möglichkeiten realisiert ist, wird nun durch Teilhepatektomie der Phosphateinbau stimuliert. Dieser Effekt addiert sich mit dem oben aufgezeigten und bringt so das gefundene Ergebnis zustande.

Hervorzuheben ist vor allem, dass der Zeitpunkt zur Induktion eines erhöhten Phosphateinbaus nach der Hepatektomie bei der hypophysektomierten Ratte identisch ist mit dem normaler Tiere. Bei der Besprechung des Thymidineinbaus soll noch einmal darauf zurückgekommen werden.

Das in Abb. 7 dargestellte Ergebnis der Thymidin-6-T(n)-inkorporation in Explantate regenerierender Leber normaler und hypophysektomierter Ratten zu verschiedenen Zeiten nach Hepatektomie stimmt nicht ganz mit den beim Phosphateinbau gefundenen Verhältnissen überein. Es zeigt sich, dass eine Steigerung des Thymidineinbaus in die Leber hypophysektomierter Ratten etwas später nach Teilhepatektomie erfolgt als bei normalen Ratten, dann aber einen höheren Spitzenwert erreicht. Für diesen gelten die gleichen Überlegungen wie für die bei den Versuchen mit Phosphat gefundenen. Sie mögen vorgetäuscht sein durch die höhere Zellkernzahl, bei gleichen Gewichten der Leberexplantate hypophysektomierter Ratten, oder bedingt sein durch Ploidisierungsprozes-

se, wie sie DI STEFANO (62) als Folge von STH-Behandlung von hypophysektomierten Ratten zeigen konnte. (Das Kulturmedium enthält naturgemäss Hypophysenhormone!). Schliesslich ist bei der geringen Anzahl untersuchter Zeitpunkte nicht ausgeschlossen, dass das tatsächliche Maximum für normale regenerierende Leber doch höher ist als für die Leber hypophysektomierter Ratten. Dies lässt sich auch nicht durch die Versuche in vivo entscheiden, weil hier wiederum das Thymidin nicht so exakt dosierbar ist, dass sich vergleichbare Werte ergeben. Die Schwierigkeit liegt hier in der Differenz von Organ-Plasmarelationen zwischen normalen und hypophysektomierten Tieren, so dass selbst bei genauer Dosierung pro Gramm Körpergewicht nicht angenommen werden kann, dass die Lebern normaler und hypophysektomierter Tiere pro Zeiteinheit gleiche Mengen Thymidin angeboten bekommen.

So bestätigt die Untersuchung der Thymidinaufnahme in die DNS regenerierender Leber in vivo lediglich, dass die Leber hypophysektomierter Tiere später zu einer Synthesesteigerung stimuliert wird, als die normaler Tiere. Über das genaue Ausmass der DNS-Synthese gibt sie keine Auskunft.

Die Annahme, dass die Thymidinaufnahme in regenerierende Leber hypophysektomierter Ratten in vivo geringer ist als normal, in vitro aber, unter der Wirkung der Hypophysenhormone höher als normal, passt zwar zu den Abbildungen, ist aber nicht bewiesen. Ebenso ist die Deutung des weniger steilen Kurvenverlaufs bei der Thymidinaufnahme in vivo als Zeichen einer verlangsamten DNS-Synthese hypothetisch.

Dagegen ergibt die Autoradiographie genau die Zahl, der zum untersuchten Zeitpunkt DNS-synthetisierenden Zellen.

Hier bestätigt sich wiederum, dass der Beginn der DNS-Synthese bei der Leberregeneration in hypophysektomierten Ratten etwa um 15 Stunden gegenüber dem der normalen Ratten verzögert ist. Die Maxima DNS-synthetisierender Zellen sind aber gleich hoch. Ein wellenförmiger Verlauf der DNS-Synthese, wie er sich, in Übereinstimmung mit CATER (13), für die normale, regenerierende Leber signifikant ergab, konnte im untersuchten Zeitraum für die regenerierende Leber hypophysektomierter Tiere nicht nachgewiesen werden. Der weniger steile Kurvenverlauf für die Werte hypophysektomierter Tiere, fand sich auch bei der Bestimmung der aufgenommenen Thymidinmenge und wurde dort besprochen. Sollte die Deutung als Zeichen einer verlangsamten, verlängerten DNS-Synthese zutreffen, sind die beiden Maxima in ihrer Höhe nicht vergleichbar. Mit entsprechenden Vorbehalten kann für diese Deutung auch der Befund WEINBRENS (70) herangezogen werden, der für die Mitosemaxima mit 30 Stunden einen weit grösseren Zeitabstand fand, als er hier für die Maxima der DNS-Syn-

these gefunden werden konnte.

Wir können also aus den bisher gegebenen Befunden in Übereinstimmung mit allen anderen Untersuchern folgern, dass auch nach Hypophysektomie eine Leberregeneration stattfindet, dass sie aber zeitlich verspätet einsetzt. Ob diese zeitliche Verspätung der DNS-Synthese Ausdruck einer verlangsamten Synthese oder einer verspäteten Stimulierung ist, kann nicht entschieden werden.

Von den bisherigen Untersuchern wurde diese Verspätung als Folge einer verschlechterten Ausgangslage und verschlechterter nutritiver Versorgung der Leberzelle hypophysektomierter Ratten angesehen, zumal sie nachweisen konnten, dass durch Hungernlassen der Ratten die Leberregeneration in gleicher Weise verzögert wurde (18, 29).

Auch die Befunde von GESCHWIND, LI und EVANS (20, 21, 22), die eine Beeinflussung der Phosphorylierungsprozesse durch die Hypophyse wahrscheinlich machen, oder die Arbeit von BULLOUGH (11), der einen Einfluss des Insulins auf die Leberregeneration fand, münden schliesslich in diese Erklärung.

Dem Vergleich unserer mit P^{32} und Thymidin-6-T(n) gewonnenen Ergebnisse muss vorausgeschickt werden, dass mit der Messung des Einbaus von P^{32} auch Stoffwechselleistungen erfasst werden, die nichts mit der Zellvermehrung zu tun haben. Eine Vermehrung der Albuminproduktion der Leber drückt sich z.B. ebenso in einem erhöhten Umsatz von Phosphat aus, wie die DNS-Synthese die das Kennzeichen für echtes Wachstum ist.

Wenn wir nun nach der Teilhepatektomie in der Rattenleber einen erhöhten Umsatz von Phosphat nachweisen, kann dies ebenso gut erhöhten Funktionsstoffwechsel wie Synthesestoffwechsel mit dem Ziel der Zellvermehrung bedeuten. Wir wissen, dass nach Zweidrittelresektion der Leber das verbliebene Drittel die Leberfunktion aufrecht erhält und können daraus folgern, dass die verbliebenen Einzelzellen nun einen fast um das dreifache erhöhten Funktionsstoffwechsel haben müssen.

Andererseits sehen wir bei normalen, regenerierenden Lebern, dass der Phosphat-einbau, in Übereinstimmung mit dem Einbau von Thymidin -einem spezifischen Indikator für die DNS-Synthese- ansteigt und abfällt. Wir erhalten also bei Messung des Phosphateinbaus einen Wert, der sich aus einer Grösse für den Funktionsstoffwechsel und einer solchen für den Synthesestoffwechsel zusammensetzt. Die Grösse der einzelnen Komponenten ist dabei unbekannt. Auf der Suche nach den regulierenden Faktoren des Wachstums müssen wir die beiden Komponenten aber trennen, denn der Funktionsstoffwechsel muss seinen eigenen, wenn

auch von der Syntheseregulation nicht ganz losgelöst, Regulationsmechanismus haben.

Im Zusammenhang mit dem Befund, dass bei hypophysektomierten Ratten die Phosphataufnahme in die regenerierende Leber schon vor der eigentlichen DNS-Synthese stark ansteigt, haben wir uns zu fragen, ob dies nicht dadurch bedingt ist, dass in der Zelle der hypophysektomierten Ratte mehr Stoffwechselschritte bis zur DNS-Synthese nötig sind als in normaler oder ob in hypophysektomierten Tieren der Faktor, der die Leberregeneration stimuliert, später ausgeschüttet wird, bzw. seine kritische Konzentration später erreicht als in normalen Tieren und die bis dahin verstreichende Zeit durch einen erhöhten Funktionsstoffwechsel überbrückt wird oder ob der Rezeptor für den fraglichen Faktor in hypophysektomierten Tieren weniger empfindlich ist als in normalen.

Nachdem in der Leber hypophysektomierter Ratten eine starke Verarmung an RNS nachgewiesen wurde (62), liegt die Vermutung nahe, dass die an RNS verarmte Leberzelle, um sich teilen zu können, mehr RNS produzieren muss als die normale, und dazu auch mehr Zeit braucht. Da die Zelle hypophysektomierter Ratten auch sonst an Substratmangel leidet, z.B. Glucosemangel, ist es durchaus denkbar, dass eine, für die eigentliche DNS-Synthese vorauszusetzende Stoffwechselsituation später erreicht wird als normal. Der in Abbildung 10 gezeigte verbreiterte Gipfel maximaler DNS-Synthese kann in diesem Sinne gedeutet werden. Er ist an entsprechender Stelle im einzelnen besprochen.

Endgültig lässt sich diese Frage nicht beantworten. Auch die Beobachtung der Stromazellen liefert einen Beitrag zu dieser Diskussion:

In Übereinstimmung zu der Beschreibung von OEHLERT (47) liess sich in den Autoradiogrammen normaler regenerierender Leber ein stark gesteigerter Einbau von Thymidin in Stromazellen erst etwa 32 Stunden nach der Hepatektomie nachweisen. OEHLERT äusserte auf Grund dieser Beobachtung die Vermutung, dass das Wachstum der genannten Zellen erst durch das Wachstum der Leberzellen induziert sei, weist allerdings auf die Beobachtung ATERMANs (4) hin, der histologische Veränderungen in diesen Zellen fand, aus denen er auf eine eigene Wachstumssteuerung dieser Zellen schliesst.

Zunächst erscheint denkbar, dass das Wachstum der Parenchymzellen wiederum der Reiz sei für die Zellen der Blutgefässe und Gallengänge, ihrerseits zu wachsen, um das volle Leberbild wiederherzustellen. Dass unter dieser Annahme der Zeitraum zwischen Stimulation und Wachstum bei der hochaktiven, mit Speicherstoffen und produktiven Elementen vollgestopften Leberzelle länger wäre

an bei den Sternzellen, ist bei Berücksichtigung ihres hohen Differenzierungsgrades ebenfalls vorstellbar. Der hier mitgeteilte Befund, dass bei der hypophysektomierten Ratte die Zellen der genannten Gruppe nahezu gleichzeitig mit den Parenchymzellen die erste Steigerung der DNS-Syntheseaktivität zeigen, schliesst diese Möglichkeit praktisch aus.

Auch das Wachstum der Endothelien und Gallengangszellen wird offensichtlich direkt durch die Hepatektomie ausgelöst.

Die Frage, warum die Parenchymzellen und anderen Zellen der Leber zu verschiedenen Zeiten auf die Hepatektomie reagieren, führt, wie schon angedeutet, wieder zum verzögerten Einsatz der DNS-Synthese in den Parenchymzellen hypophysektomierter Ratten zurück. Danach ist es denkbar, dass die Hypophysektomie durch negative Beeinflussung der allgemeinen Stoffwechsellage (Nahrungsaufnahme, Phosphorylierungsvorgänge etc.) die normalerweise durch Anhäufung des nötigen Substrats schnell zur DNS-Synthese fähige Leberzelle in den Status der substratarmen Sternzelle überführt, die zur Vermehrung nötiges Substrat erst ansammeln muss und dadurch mehr Zeit bis zur DNS-Synthese benötigt.

Alle bisher besprochenen Versuchsergebnisse sind Beiträge zur Erkenntnis der Modulation eines Wachstumsvorgangs, die schliesslich bei aller Kompliziertheit der Versuchsanordnung und Gedankengänge die Konsequenz haben: Mehr Substrat = mehr Effekt. Von dem stimulierenden Faktor im Serum teilhepatektomierter Ratten, der eigentlich immer im Hintergrund unserer Fragen stand, liess sich nur feststellen, dass er nicht von der Hypophyse stammt, im Serum hypophysektomierter Ratten aber möglicherweise verspätet auftaucht, bzw. wirksame Werte erreicht. Die Untersuchung des Einflusses der Hypophyse auf die Leberregeneration hat aber auch eine neue positive Erkenntnis über diesen Faktor gebracht:

Die zur Vollständigkeitskontrolle der Hypophysektomie histologisch untersuchten Hoden zeigten erwartungsgemäss alle Zeichen der Atrophie und nicht die geringste Spur von Spermiogenese. Bei autoradiographischen Untersuchungen aber zeigte sich, dass in den Hoden hypophysektomierter Tiere nach Teilhepatektomie ein Grossteil der Spermatogonien markiert war: also im Begriffe, DNS zu synthetisieren.

Da bisher nur ein Stoff bekannt ist, der die Spermatogonien zur Vermehrung stimuliert, nämlich das FSH der Hypophyse (34), das in den hypophysektomierten Tieren nicht vorhanden war, muss angenommen werden, dass die beobachtete DNS-Synthese in den Spermatogonien dieser Tiere durch die Hepatektomie ausgelöst wurde. Die an normalen, teilhepatektomierten Ratten erhobe-

nen Befunde deuten darauf hin, dass auch bei ihnen durch die Teilhepatektomie die Spermiogenese stimuliert wird.

Es muss noch die Rolle des Progesterons diskutiert werden. Dieses Hormon kommt vor allem vom Gelbkörper weiblicher Individuen, wird aber in geringen Mengen auch in Nebenniere und Hoden männlicher Tiere gebildet. Es ist im allgemeinen für die Spermiogenese bedeutungslos. Es konnte aber im Tierversuch nachgewiesen werden, dass es in hohen Dosen einen leicht fördernden Einfluss im Sinne einer Hodenvergrösserung hat (34). Auch gelang es, die Spermiogenese nach Hypophysektomie durch Progesteronzufuhr eine Zeitlang aufrechtzuerhalten (34). Die normalerweise im männlichen Organismus vorkommenden Mengen dieses Hormons genügen jedoch zu solchen Wirkungen nicht, wie ja schon durch die Hodenatrophie nach Hypophysektomie hinreichend demonstriert ist. Da das Progesteron grösstenteils in der Leber abgebaut wird (34), wäre denkbar, dass nach Teilhepatektomie eine diesbezügliche Insuffizienz der Restleber ein Steigen des Progesteronspiegels bis zu Spermiogenese stimulierenden Werten zur Folge hätte. Gegen diese Vorstellung spricht die Tatsache, dass die Leber trotz Zweidrittelresektion im allgemeinen ihre Funktion aufrechterhält. Ausserdem würden im Falle einer Insuffizienz auch die Oestrogene nicht mehr ausreichend abgebaut (66) und diese hemmen die Spermiogenese. Das zeigt auch der Befund, dass 57 % aller Patienten mit Lebercirrhose eine deutliche Hodenatrophie haben (5). Eine Abnahme von Libido und Potenz, sowie Hodenverkleinerung bei Lebercirrhose wird auch von LLOYD und WILLIAMS (39) berichtet.

Es darf also angenommen werden, dass die beobachtete Stimulierung der Spermatogonien zur DNS-Synthese durch einen noch unbekannten Faktor erfolgte, der durch die Hepatektomie wirksam wird.

Dieser Befund passt zu jenen, die PASCHKIS, GODDARD, CANTAROW und ADIBI erhoben. Sie fanden, dass die Hepatektomie bei hypophysektomierten Tieren von einem Wachstum der Tibiaepiphysenfuge gefolgt ist. Ausserdem fanden sie ein Anwachsen der Mitoserate in Cornea und kompensatorisch hypertrophierender Niere nach Hepatektomie in normalen Ratten. Sie schlossen daraus, dass der nach Teilhepatektomie wirksam werdende wachstumsstimulierende Faktor nicht organspezifisch ist. Von diesem Faktor kann also festgestellt werden, dass er sowohl das STH in seiner Wirkung auf die Epiphysenfuge, als auch das FSH in seiner Wirkung auf die Sperimogenese ersetzen kann.

Vom Reaktionssystem her betrachtet, ist zu bemerken, dass die Zellen der Epiphysenfuge, wie die Basalzellen der Epidermis oder die Spermatogonien in die Gruppe der Keimgewebe gehören. Es sind Zellen, deren eigentliche Funktion

die Vermehrung ist, im Gegensatz zu jenen Zellen, deren Hauptaufgabe es ist, Exkrete zu bilden oder sich zu verkürzen oder Stützsubstanz einzulagern.

In der Leber finden sich Zellen, die auf verschiedene Aufgaben hochspezialisiert sind und normalerweise eine geringe Tendenz zur Teilung zeigen. Es taucht hier der Gedanke auf, ob nicht nach partieller Hepatektomie vor der eigentlichen Stimulierung der Leberzellen durch den oben genannten, noch unbekannten Faktor, die Leberzellen teilungsbereit gemacht werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

An 180 g schweren männlichen Ratten wurden vier Wochen nach Hypophysektomie in vivo und in vitro Untersuchungen zur Leberregeneration durchgeführt. Als Indikatoren für den Stoffwechsel dienten P^{32} und Thymidin-6-T(n).

Es ergaben sich folgende Befunde:

1. Normale explantierte Leber und Niere hypophysektomierter Tiere nimmt mehr Phosphat und weniger Thymidin auf als normale explantierte Leber und Niere unbehandelter Tiere. Als Ursache der erhöhten Phosphataufnahme wird eine Wirkung der Hypophysenhormone im Nährmedium diskutiert. Der Thymidineinbau (die DNS-Synthese) wird aber durch das Nährmedium offensichtlich nicht in dieser Weise gesteigert und bleibt bei hypophysektomierten Ratten unter der Norm.
2. Explantierte, regenerierende Leber hypophysektomierter Ratten nimmt zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Hepatektomie mehr Phosphat auf als normale, regenerierende Leber. Dagegen tritt die Steigerung des Thymidineinbaus in regenerierender Leber hypophysektomierter Tiere verspätet auf.

Es wird die Existenz zweier Regelkreise diskutiert, von denen der eine den Funktionstoffwechsel, der andere den Synthesestoffwechsel betrifft. Ein Einfluss der Hypophyse wird vor allem für ersteren, möglicherweise auf dem Weg über die Phosphorylierungsvorgänge, erörtert.

3. Der Thymidineinbau (die DNS-Synthese) in regenerierende Leber in vivo erfährt bei hypophysektomierten Ratten gegenüber normalen eine verspätete Steigerung, wobei die Maximalwerte wahrscheinlich geringer sind, während die Zahl Thymidin inkorporierender Zellen (autoradiographisch be-

stimmt), in beiden Maxima annähernd gleich ist.

Es wird sowohl eine verspätete Induktion zur Wachstumssteigerung, wie eine Verlangsamung der DNS-Synthese in der Einzelzelle diskutiert.

4. Die autoradiographische Beobachtung des Thymidineinbaus in Stromazellen (Endothel- und Gallengangszellen) ergab, dass diese Zellen in hypophysektomierten Ratten, nicht wie die Leberparenchymzellen, mit der Steigerung des Thymidineinbaus weit hinter der normaler Ratten einsetzten, sondern fast gleichzeitig mit den Stromazellen normaler, regenerierender Leber in das Stadium gesteigerter DNS-Synthese treten. Es wird die Existenz einer für diese Zellen spezifischen, von den Parenchymzellen unabhängigen Wachstumsregulation diskutiert.
5. Die Spermatogonien in den atrophischen Hoden hypophysektomierter Ratten werden durch die Hepatektomie zur DNS-Synthese stimuliert. Damit ist gezeigt, dass ein im Serum teilhepatektomierter Tiere nachzuweisender, wachstumsstimulierender Faktor nicht streng leberspezifisch ist.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Abercrombie M.:
Localized formation of new tissue in adult mammal.
Symposia Soc. Exper. Biol. 11, 235, 1957.
- 2) Adle E.H., Paschkis K.E. and Cantarow A.:
The Influence of thyroid hormone and of thiouracil on
liver regeneration in the rat.
Acta endocrinol. 29, 435, 1958.
- 3) Astarabadi T.M., Essex H.E. and Grindlay I.H.:
The effect of hypophysectomy in dogs.
Endocrinology 52, 652, 1953.
- 4) Aterman K.: Arch. Path. 53, 197, 1952
zitiert nach Oehlert (47).
- 5) Benett H. S., Baggenstoss A. H. and Butt H. R.:
The testis breast and prostate of men who die of cirrhosis
of the liver.
Am. J. clin. Path. 20, 814, 1950.
- 6) Blomquist K.: Growth stimulation in the liver and tumor development
following intraperitoneal injections of liver homogenats
in the rat.
Acta path. et microbiol. scandinav. Suppl. 121, 1957.
- 7) Bollum F. U. and Potter V. R.:
Soluble Enzymes which convert Thymidine to Thymidine
Phosphates and DNA.
Canc. Res. 19, 561, 1959.
- 8) Brues A. M., Brury D. R. and Brues M. C.:
A quantitative study of cell growth in regenerating liver.
Arch. Path. 22, 658, 1936.
- 9) Brues A. M. and Marble B. B.:
Analysis of mitosis in liver restoration.
J. Exper. Med. 65, 15, 1937.
- 10) Bucher N. L. R., Scott I. F. and Aub I. C.:
Regeneration of the liver in parabiotic rats.
Canc. Res. 11, 457, 1951.

- 11) Bullough W.S.: Hormones and Mitotic Activity.
Vit. and Horm.13, 261-292, 1955.
- 12) Canzanelli A., Guild R. and Rapport D.:
Pituitary and adreno-cortical relationships to liver regeneration and nucleic acids.
Endocrinology 45, 91, 1949.
- 13) Cater D.B., Holmes B.E. and Mee L.K.:
Cell Division and Nucleic Acid Synthesis in the Regenerating Liver of the Rat.
Acta radiol.46, 655, 1956.
- 14) Christensen B.G. and Jacobsen E.:
Studies on liver regeneration.
Acta med.scandinav.Suppl.234, 103, 1949.
- 15) Dische Z.: Mikrochemie 8, 4, 1930
zitiert nach Wrba, Rabes, Brändle (75).
- 16) Doerr P.: Dissertation München 1963.
- 17) Fogelman J.M. and Ivy A.C.:
Effect of thiouracil on liver regeneration.
Am.J.Physiol.153, 397, 1948.
- 18) Franseen C.C., Brues A.M. and Richards R.L.:
The effect of hypophysectomy on the restoration of the liver following partial hepatectomy in rats.
Endocrinology 23, 292-301, 1938.
- 19) Friedrich-Freska H. and Zaki F.G.:
Spezifische Mitoseauslösung in normaler Rattenleber durch Serum partiell hepatektomierter Ratten.
Ztschr.f.Naturforsch.96, 394-397, 1954.
- 20) Geschwind I.I., Li C.H. and Evans H.M.:
The Partition of Liver Nucleic Acids after Hypophysectomy and Growth Hormone Treatment.
Arch.Biochem.28, 73, 1950.
- 21) Geschwind I.I., Li C.H. and Evans H.M.:
The Effect of Hypophysectomy, Growth and Adrenocorticotrophic Hormones on the Incorporation of p^{32} into Liver Phospholipids.
Endocrinology 47, 162, 1950 a.

- 22) Geschwind I.I., Li C.H. and Evans H.M.:
Effects of Hypophysectomy and of Growth Hormone on the
Uptake of Radioactive Phosphorus by Tissues.
Arch.Biochem.31, 168, 1951.
- 23) Glinos A.D. and Gey G.O.:
Humoral Factors Involved in the Induction of Liver Rege-
neration in the Rat.
Proc.Soc.Exper.Biol.Med.80, 421-425, 1952.
- 24) Glinos A.D.: Mechanism of Growth Control in Liver Regenerating.
Science 123, 673-674, 1956.
- 25) Grisham J.W.: A morphologic Study of DNA-Synthesis and Cell Prolifera-
tions in Regenerating Rat Liver; Autoradiography with
Thymidine- H^3 .
Canc.Res.22, 842, 1962.
- 26) Hecht L.J. and Potter V.R.:
Nucleic Acid Metabolism in Regenerating Rat Liver. The
Rate of DNA-Synthesis in Vivo.
Canc.Res.16, 988, 1956.
- 27) Hemingway J.T. and Cater D.B.:
Effects of Pituitary Hormones and Cortisone upon Liver Re-
generation in the Hypophysectomized Rat.
Nature 181, 1065-1066, 1958.
- 28) Higgins G.M. and Anderson R.M.:
Experimental Pathology of the Liver of the White Rat
Following Partial Surgical Removal.
Arch.Path.12, 186-202, 1931.
- 29) Higgins G.M., Ingle D.J.:
Regeneration of liver in hypophysectomized white rats.
Anat.Rec.73, 95, 1939.
- 30) Jaffe J.J.: Diurnal mitotic periodicity in regenerating rat liver.
Anat.Rec.120, 935, 1954.
- 31) Johnson R.M. and Albert S.:
The uptake of radioactiv Phosphorus by rat liver following
partial hepatectomy.
Arch.Biochem.35, 340, 1952.

- 32) Kelly L.S. and Jones J.B.:
Influence of homologous tissue factors on DNA turnover
and radiation protection.
Am.J.Phys.172, 575, 1953.
- 33) Kohn R.:
Effect of administration of rat serum on rat liver regeneration.
Exper.Cell.Res.14, 228, 1958.
- 34) Landois-Roseman:
Lehrbuch der Physiologie des Menschen.
Herausgeber H.-U.Rosemann, 28.Auflage, Bd.I, Verlag
Urban u. Schwarzenberg, München-Berlin, S.441, 1960.
- 35) Leatham I.H. and Seely R.D.:
Plasma and liver protein concentrations of rats fed thiouracil.
Am.J.Physiol.149, 561, 1947.
- 36) Leduc E.H.:
In The Liver.
Hrsg. Ch.Rouiller, Academic Press, New York and London, 1964.
- 37) Levine R.:
On the mechanism of Action of Hormones on Cells.
Surv.Biol.Prog.3, 185-213, 1957.
- 38) Li C.H. and Evans H.M.:
The Biochemistry of Pituitary Growth Hormones.
Rec.Prog.Horm.Res.III, 1948.
- 39) Lloyd G.W. and Williams R.H.:
Endocrine changes associated with Leanne's cirrhosis of the liver.
Amer.J.Med.4, 315, 1948.
- 40) Mangalik V.S., Mehrotra R.M.L. and Agarwal K.C.:
Role of thyroidgland in liver regeneration.
Indian I.M.Sc.8, 477, 1954.
- 41) Mann F.C.:
The portal circulation and restoration of the liver after partial removal.
Surgery 8, 225, 1940.

- 42) Marescotti V., Luisi M., Carnicelli A.:
Experimentelle Untersuchungen über die hypothalamische
Kontrolle der Hodenfunktion.
Endokrinologie 41, 261-273, 1961.
- 43) Marshak A. and Walker A.C.:
Effect of liver fractions on mitosis in regenerating liver.
Am.J.Physiol. 143, 226, 1945.
- 44) McJunkin F.A. and Breuhaus H.C.:
Homologous liver as a stimulans to hepatic regeneration.
Arch.Path. 12, 900, 1931.
- 45) Muschke H.E.: Histometrische Untersuchungen am Rattenhoden nach Hypophysektomie und Choriogonadotropinzufuhr.
Endokrinologie 30, 281, 1953.
- 46) Nygard O. and Rusch H.P.:
Incorporation of radioactiv phosphate into nucleic acids
of regenerating rat liver.
Canc.Res. 15, 240, 1955.
- 47) Oehlert W., Hämmerling W. und Büchner R.:
Der zeitliche Ablauf und das Ausmass der DNS-Synthese
in der regenerierenden Leber der Ratte nach Teilhepatek-
tomie.
Beitr.Path.Anat. 126, 91-112.
- 48) Paschkis K.E., Cantarow A., Stasney I. and Hobbs I.H.:
Tumor Growth in Partially Hepatectomized Rats.
Canc.Res. 15, 579, 1955.
- 49) Paschkis K.E., Goddard A. and Adibi S.:
Stimulating of growth by partial hepatectomy.
Proc.Soc.Exper.Biol. and Med. 101, 184, 1959.
- 50) Paschkis K.E., Cantarow A., Goddard J.J. and Zagerman J.:
Growth promoting Activity of Liver Preparations and other
Tissue Preparations.
Fed.Proc. 17, 121, 1958.
- 51) Perez-Tamay O.R., Murphy W.R. and Ihnen M.:
Effect of cortisone and partial starvation on liver regene-
ration.
A.M.A.Arch.Path. 12, 787, 1931.

- 52) Popper und Schaffer:
Die Leber.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1960.
- 53) Post I., Himes M.B., Klein A. and Hofman I.:
Responses of the liver to injury.
A.M.A. Arch. Path. 64, 278, 1957.
- 54) Rabes H.:
Untersuchungen zur humoralen Regulation bei regenerativem
und malignem Wachstum.
Habilitation München 1965.
- 55) Rabes H. und Wrba H.:
Zur Spezifität der Hemmwirkung von Serum teilhepatek-
tomierter Ratten auf den Stoffwechsel in vitro suspendierter
Ascitestumorzellen.
Klin. Wschr. 38, 1250, 1960.
- 56) Rabes H. und Wrba H.:
Zur Wirkung von Serum hepatektomierter Tiere auf Sus-
pensionen von Tumorzellen.
Klin. Wschr. 39, 206, 1961.
- 57) Reiss M., Druckrey H. und Hochwald A.:
Überenergetische Grundlagen endogener Wirkungen.
III. Der Einfluss der Hypophysektomie auf den Hodenstoff-
wechsel.
Endokrinologie 12, 243, 1933.
- 58) Roberts K.B., Florey H.W. and Joklik W.K.:
The influence of cortisone on cell division.
Quart. J. Exper. Physiol. 37, 239, 1952.
- 59) Rous P. and Larimore L.D.:
Relations of the portal blood to liver maintenance.
J. Exper. Med. 31, 609, 1920.
- 60) Sherlock S.:
Krankheiten der Leber und der Gallenwege.
3. Auflage, J. F. Lehmanns Verlag München, 1965.
- 61) Smythe R.L. and Moore R.O.:
A Study of possible humoral factors in liver regeneration
in the rat.
Surgery 44, 561, 1958.

- 62) Di Stefano H.S., Diermeier H.F. and Teppermann I.:
Effects of Growth Hormone on Nucleic Acid and Protein
Content of Rat Liver Cells.
Endocrinology 51, 386, 1952.
- 63) Stephenson G.W.:
Restoration of the liver after partial hepatectomy and
partial ligation of the portal vein.
Arch.Path. 14, 484, 1932.
- 64) Stich H.F. and Florian M.L.:
The presence of a mitosis inhibitor in the serum and li-
ver of adult rats.
Canad.J.Biochem. and Physiol. 36, 855, 1958.
- 65) Swann M.M.: The control of Cell Division; a review. II. Special me-
chanisms.
Canc.Res. 18, 1118, 1958.
- 66) Tagnon H.J., Liebermann S., Schulmann P. and Brunschwig A.:
The metabolism of estrogens by the human liver studied
in vitro.
J.clin.Invest. 31, 346, 1952.
- 67) Teir H. and Ravanti K.:
Mitotic activity and growth factors in the liver of the
white rat.
Exper.Cell.Res. 5, 500, 1953.
- 68) Tonutti E.O., Weller E., Schuchardt E. und Heinke E.:
Die männliche Keimdrüse.
S.104 ff, Stuttgart, 1960.
- 69) Weinbren K.: The portal blood supply and regeneration of the rat liver.
Brit.J.Exper.Path. 36, 583, 1955.
- 70) Weinbren K.: Regeneration of the Liver.
Gastroenterology 37, 657-668, 1959.
- 71) Weiss P.A.: The Problem of specificity in growth and development.
Yale J.Biol. and Med. 19, 234, 1947.
- 72) Weiss P.A.: Biological Specificity and Growth.
Hrsgb. E.G.Butler, S.195, Princeton University Press,
Princeton, N.I., 1955.

- 73) Wennecker A.S., Sussmann H.:
Regeneration of Liver Tissue Following Partial Hepatectomy in Parabiotic Rats.
Proc.Soc.Exp.Biol.and Med.76, 683-686, 1951.
- 74) Wilson I.W. and Leduc E.H.:
Mitotic rate in mouse liver following intraperitoneal injection of liver, kidney and egg yolk.
Anat.Rec.97, 471, 1947.
- 75) Wrba H., Rabes H., Brändle H.:
Synthesis of deoxyribonucleic acid in the liver of hypophysectomized rats after partial hepatectomy.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. im Druck.
- 76) Wrba H., Rabes, H., Ripoll-Gomez M. und Ranz H.:
Die stoffwechselsteigernde Wirkung von Serum teilhepatektomierter Tiere auf Leberkulturen.
Exp.Cell.Research 26, 70-77, 1962.
- 77) Wrba H., Rabes H., Schneider L.V. und Kageyama R.:
Die spezifische Wirkung von Serum teilhepatektomierter Ratten auf Tumorzellen in vitro.
Z.Krebsforschung 64, 278-282, 1961.
- 78) Wrba H., Rabes H. und Zintl W.:
Zur Persistenz humoraler Wachstumsvorgänge in der Leber in vivo und im Explantat.
Virchows Archiv 336, 12-15, 1962.
- 79) Wrba H. und Rabes H.:
Das Fortbestehen in vivo ausgelöster Wachstumsvorgänge an explantierten Organen.
Naturwissenschaften 49, 60, 1962.
- 80) Wrba H. und Rabes H.:
The action of serum from partially hepatectomized rats on explants of liver and tumors.
Canc.Res.23, 1116-1120, 1963.
- 81) Wrba H. und Rabes H.:
Der Umsatz radioaktiv markierter Verbindungen als Massstab für die Stoffwechselintensität explantierter Organe.
Naturwissenschaften 49, 282-283, 1963.

- 82) Wrba H.: Wachstumsfördernde Stoffe und Hemmfaktoren in Warmblütlergeweben.
Naturwissenschaften 49, 97-101, 1962.

LEBENS LAUF

Als Sohn des Kaufmanns Anton Brändle und seiner Ehefrau Franziska, geb. Mangold, wurde ich am 9. März 1938 in Kempten geboren. Ich besuchte dort und in Altusried bei Kempten fünf Jahre lang die Volksschule. Im Sommer 1949 bestand ich die Aufnahmeprüfung in die Oberrealschule der Schulbrüder zu Illertissen und legte dort 1958 die Reifeprüfung ab. Nach zwölf Monaten Wehrdienst begann ich im Nov. 1959 mein Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

Ich legte dort nach dem 2. Semester im Herbst 1960 das Vorphysikum ab und bestand im Frühjahr 1962 die ärztliche Vorprüfung. Das medizinische Staatsexamen beendete ich am 10. Juni 1965.

